



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΑΣΚΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ  
ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ SABIN 1 ΚΑΙ ECHO 12  
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΝΑ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ:  
ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ REAL TIME RT- PCR ΚΑΙ REAL TIME RT-LAMP.  
ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟ ΊΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.**

**ΛΑΡΙΣΑ**

**2021**

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ SABIN 1 ΚΑΙ ECHO 12 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΝΑ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ REAL TIME RT- PCR ΚΑΙ REAL  
TIME RT-LAMP. ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟ ΙΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

##### **ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

##### **ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

##### **ΚΑΡΑΚΑΣΙΛΙΩΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιολογίας  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θράκης

#### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

##### **ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

##### **ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

##### **ΓΚΑΡΤΖΟΝΙΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

##### **ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

##### **ΚΑΡΑΚΑΣΙΛΙΩΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιολογίας  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θράκης

##### **ΚΟΤΤΑΡΙΔΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας  
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

##### **ΣΙΑΦΑΚΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Διαγνωστικής Ιολογίας  
Τμήμα Ιατρικής, Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δάσκου Μαρία

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ SABIN 1 ΚΑΙ ECHO 12 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΝΑ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ REAL TIME RT- PCR ΚΑΙ REAL  
TIME RT-LAMP. ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟ ΙΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.

**ΔΑΣΚΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**2021**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ SABIN 1 ΚΑΙ ECHO 12 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΝΑ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ REAL TIME RT-PCR ΚΑΙ REAL  
TIME RT-LAMP. ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟ ΙΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΕΣ ΣΕΛΙΔΕΣ: 15**

**ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΕΛΙΔΩΝ: 166**

**ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ: 45**

**ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ: 89**

**ΑΡΙΘΜΟΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΠΟΜΠΩΝ: 136**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Οι Εντεροϊοί είναι μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* του γένους *Enterovirus* και ταξινομούνται στην τάξη IV κατά Baltimore, καθώς το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Πρόκειται για μικρούς μη ελυτροφόρους ιούς, που διαθέτουν ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο που προστατεύει το γενετικό τους υλικό. Οι Εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο ανήκουν σε τέσσερις ομάδες: EV-A, EV-B, EV-C και EV-D και μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού. Εντοπίζονται σε κλινικά δείγματα, τρόφιμα και στο περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μοριακή μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης των στελεχών Sabin 1 και Echo 12 που ανήκουν στις ομάδες C και B αντίστοιχα, καθώς και της επίπτωσης της θερμικής αδρανοποίησης στο ιικό γονιδίωμα και κατά συνέπεια στην ικανότητα των ιών αυτών να μολύνουν κύτταρα και να ολοκληρώνουν επιτυχώς τον κύκλο ζωής τους. Η επιλογή δύο διαφορετικών ιικών στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες του ίδιου γένους έγινε με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και τον εντοπισμό ομοιοτήτων, αλλά και διαφορών όσον αφορά την αδρανοποίηση τους μέσω θέρμανσης.

Στο πρώτο στάδιο της διατριβής δημιουργήθηκαν κινητικές μελέτες για το κάθε στέλεχος στοχεύοντας 1<sup>ov</sup> το θετικό κλώνο για την ανίχνευση του γονιδιώματος τους, και κατά 2<sup>ov</sup> τον αρνητικό κλώνο για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας τους και κατά συνέπεια της ικανότητάς τους να μολύνουν επιτυχώς κυτταρικές σειρές. Για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου σχεδιάστηκε μία ειδική Stem-loop Reverse Transcription Real-Time PCR, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση χάρη στη θερμοδυναμικά σταθερή δομή του εκκινητή που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT). Ο ειδικός stem-loop εκκινητής της RT σχεδιάστηκε ώστε να στοχεύει τμήμα της 5'UTR των Εντεροϊών, η οποία είναι μια σχετικά συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στο γένος των Εντεροϊών και μέσω αυτής της μοριακής τεχνικής είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών. Η τεχνική αυτή επέτρεψε την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) των στελεχών Sabin 1 και Echo 12 και δημιουργήθηκαν κινητικές μελέτες για τον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας των δύο στελεχών σε 2 συγκεντρώσεις, μία υψηλή της τάξης των 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> και μία χαμηλή της τάξης των 10 CCID<sub>50</sub> σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Παράλληλα δημιουργήθηκαν και κινητικές μελέτες για την ανίχνευση του θετικού κλώνου μέσα στα

κύτταρα σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Για την ανίχνευση του θετικού κλώνου, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν Real-Time PCR με το universal εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 που στοχεύει στην 5'UTR περιοχή του θετικού κλώνου των Εντεροϊών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο στελέχη εμφάνισαν παρόμοιο πρότυπο ανίχνευσης για τον αρνητικό κλώνο και για τις δύο συγκεντρώσεις. Για τη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> και για τα δύο στελέχη, ο αρνητικός κλώνος εντοπίστηκε 4 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ αντίστοιχα για τη χαμηλότερη συγκέντρωση ο αρνητικός κλώνος ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως ένα αντιγραφικά ενεργό στέλεχος S1 ή E12 σε συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> μπορεί να ανιχνευθεί σε 4 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταρικής σειράς, ενώ σε συγκέντρωση  $10$  CCID<sub>50</sub> μέσα σε 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τα αποτελέσματα αυτά συγκριτικά με την εμφάνιση κυτταρικών αλλοιώσεων σε κυτταρικές σειρές αποδεικνύουν ότι η τεχνική Stem-Loop Reverse Transcription Real-Time PCR εντοπίζει την αντιγραφική ενεργότητα των Εντεροϊών σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από ότι η κυτταροκαλλιέργεια. Όσον αφορά το θετικό κλώνο, αυτός ανιχνεύθηκε και για τα δύο στελέχη στην υψηλή συγκέντρωση 2 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ για τη χαμηλή συγκέντρωση των στελεχών S1 και E12 εντοπίζεται 2 και 4 ώρες αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αυτή διαφορά ανάμεσα στους δύο κλώνους οφείλεται στο γεγονός ότι ο θετικός κλώνος βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (30-50 φορές) από ότι ο αρνητικός μέσα στα κύτταρα.

Επιπλέον οι κινητικές μελέτες που αναπτύχθηκαν για τη χαμηλότερη συγκέντρωση  $10$  CCID<sub>50</sub> εφαρμόστηκαν και σε 15 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) τα οποία είχαν ήδη χαρακτηριστεί θετικά για την ύπαρξη Εντεροϊού. Αυτή η επιλογή έγινε καθώς στο ENY οι Εντεροϊοί βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αποδείχτηκε πως μόνο σε 5 από το σύνολο των 15 κλινικών δειγμάτων ανιχνεύθηκαν αντιγραφικά ενεργοί Εντεροϊοί, ενώ σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε το γονιδίωμα του θετικού κλώνου. Τα στελέχη τα οποία βρέθηκαν θετικά και για τους δύο κλώνους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως 3/5 ταυτοποιήθηκαν ως ιοί Echovirus 30, 1/5 ταυτοποιήθηκε ως ιός Coxsackievirus B3 και 1/5 ως ιός Coxsackievirus B5, αποδεικνύοντας πως μέσω της παρούσας μοριακής τεχνικής, είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών, αφού ο σχεδιασμός του ειδικού stem-loop εκκινητή της RT έγινε στοχεύοντας τμήμα της 5'UTR των Εντεροϊών.

Οι συγκεκριμένες κινητικές μελέτες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως επιβεβαιωτική μέθοδος για την εξακρίβωση της επιτυχούς αδρανοποίησης διαφόρων στελεχών των Εντεροϊών, κερδίζοντας αρκετό χρόνο συγκριτικά με τις κυτταροκαλλιέργειες. Ακόμη, βρίσκουν εφαρμογή σε στελέχη Εντεροϊών τα οποία δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε υπάρχουσες κυτταρικές σειρές, όπως για παράδειγμα ορισμένα στελέχη ιών Coxsackie A.

Στο επόμενο στάδιο, εντοπίστηκαν οι κατάλληλες θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αδρανοποίηση των στελεχών S1 και E12 σε μία πολύ υψηλή ( $10^6$ CCID<sub>50</sub>) και μία χαμηλή συγκέντρωση ( $10$  CCID<sub>50</sub>) χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές παράλληλα με τη χρήση κυτταροκαλλιεργιών. Ακολούθησε διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στο γονιδίωμα των ιών για πρόκληση ρήξεων, στοχεύοντας τις γενωμικές περιοχές (5'UTR, 3C, 3D και 3'UTR) όπου διαπιστώθηκε πως η πιο ευαίσθητη περιοχή στη θέρμανση είναι η 3'UTR, σε αντίθεση με την 5'UTR που εντοπίστηκε ως η πιο ανθεκτική. Ακολούθως, λόγω της σημασίας της περιοχής 5'UTR για την ανίχνευση των Εντεροϊών, η περιοχή αυτή μελετήθηκε πιο εκτεταμένα όσον αφορά το σημείο πρόκλησης θραύσης μετά από θέρμανση στη θερμοκρασία των 82°C, που προσδιορίστηκε ως η κατάλληλη θερμοκρασία για την πλήρη αδρανοποίηση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν όταν η συγκέντρωσή τους ήταν ιδιαίτερα υψηλή ( $10^6$ CCID<sub>50</sub>). Έτσι, προσδιορίστηκε πως η ρήξη στη συγκεκριμένη περιοχή δημιουργείται κοντά στη θέση πρόσδεσης του universal εκκινητή UC53 (θέση 588-606nt) πάνω στην αλληλουχία της 5'UTR. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν ελέγχοντας επιπλέον την περιεκτικότητα σε GC των δύο αυτών περιοχών.

Επόμενος στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας ευαίσθητης, ειδικής, ισοθερμικής μοριακής τεχνικής ανίχνευσης των Εντεροϊών της Real Time RT-LAMP ως εναλλακτικός τρόπος επιβεβαίωσης της θερμικής αδρανοποίησης στοχεύοντας την 5'UTR. Έτσι, αναπτύχθηκε η Real Time RT-LAMP, ώστε να παρέχει σε ένα στάδιο (αντίστροφης μεταγραφής και πολλαπλασιασμού του στόχου) σε ισοθερμικές συνθήκες την ενίσχυση του RNA στόχου εντός 60 min. Σε αυτή τη μέθοδο σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 6 εκκινητές σχεδιασμένοι να στοχεύουν την 5'UTR των Εντεροϊών. Στο μίγμα της αντίδρασης εμπεριέχεται η ειδική DNA πολυμεράση με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου Bst 2.0 και η αντίστροφη μεταγραφάση WarmStartRTx. Περιέχεται επίσης και μία φθορίζουσα χρωστική η SYBR Green, ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχτηκε ότι η Real Time RT-LAMP που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον έλεγχο της επιτυχίας της αδρανοποίησης όσον αφορά το ιικό



στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10^6$ CCID<sub>50</sub>, καθώς έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με αυτά της απλής της Real Time RT-PCR. Αντίθετα, όσον αφορά το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, αποδείχτηκε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί λόγω του ορίου της ευαισθησίας της καθώς μετά τη θερμική επεξεργασία ο ιικός τίτλος μειώνεται με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του ιού να ελαττώνεται σημαντικά και να μην ανιχνεύεται. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι για τις συγκεντρώσεις κάτω των 10 CCID<sub>50</sub> η συμβατική Real Time RT-PCR είναι καταλληλότερη για τη μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα για το στέλεχος E12.

Συνοψίζοντας, προσδιορίστηκε ότι η θερμική αδρανοποίηση επηρεάζει την ακεραιότητα του γονιδιώματος των Εντεροϊών, καθώς οδηγεί στη δημιουργία ρήξεων σε πολλές περιοχές του γονιδιώματός του, με την 3'UTR να ανιχνεύεται ως η πλέον ευαίσθητη και η 5'UTR περιοχή ως η πλέον ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση. Αποδείχθηκε επίσης, ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της ιικής μολυσματικότητας και πως για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θερμικής αδρανοποίησης είναι απαραίτητος ένας πλήρης έλεγχος ο οποίος περιλαμβάνει 2-3 ανακαλλιέργειες του ιού σε ευαίσθητη κυτταρική σειρά σε συνδυασμό με την ανίχνευση ρήξεων τουλάχιστον στην 3'UTR και στην 5'UTR, και τέλος την ανίχνευση του θετικού αλλά κυρίως αρνητικού κλώνου των Εντεροϊών στην 5'UTR γενωμική περιοχή καθώς η ανίχνευση του θετικού κλώνου του RNA του γονιδιώματος των Εντεροϊών δεν αποτελεί ένδειξη ενός ενεργά αντιγραφικού ιού και κατά συνέπεια μολυσματικού ιού.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής Βακτηριολογίας-Μοριακής Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω με ιδιαίτερη θερμότητα τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη που με μύησε στον τομέα της Μοριακής Ιολογίας, ο οποίος ήταν και ο αρχικός επιβλέπων της διδακτορικής μου διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα διδακτορική διατριβή, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγησή και βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο, αφού ήταν ο επιβλέπων τόσο της προπτυχιακής, όσο και της μεταπτυχιακής και διδακτορικής μου διατριβής. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη εκτίμησή μου προς το πρόσωπό του τόσο ως επιστήμονα, όσο και ως άνθρωπο για όλη τη θετική του διάθεση και προθυμία να παρέχει τη βοήθειά του όποτε αυτή ήταν απαραίτητη τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής όσο και για τη συνέχεια της επιστημονικής μου εξέλιξης.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο, που δέχτηκε να γίνει ο επιβλέπων της διδακτορικής μου διατριβής μετά τη συνταξιοδότηση του Καθηγητή κ. Μαρκουλάτου Παναγιώτη και με εμπιστεύτηκε ως υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριό του, καθώς και για όλη τη βοήθεια και στήριξή του το διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου, αλλά και για τη συνέχεια της επιστημονικής μου καριέρας. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω θερμά, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω στο ερευνητικό πρόγραμμα του εργαστηρίου στο οποίο είναι επιστημονικός υπεύθυνος, καθώς και για την πολύ καλή διάθεση και αντιμετώπιση του προς το πρόσωπό μου όλη την περίοδο συνεργασίας μας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καρακασιλιώτη Ιωάννη για τη βοήθειά τους και που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς μου συμβουλευτικής επιτροπής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Σουρβίνο Γεώργιο, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Κοτταρίδη Χριστίνα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σιαφάκα Νικόλαο, που δέχτηκαν να είναι μέλη της επταμελούς μου συμβουλευτικής επιτροπής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω το μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Δρ. Δημητρίου Τηλέμαχο για την ανεκτίμητη βοήθεια του στο εργαστήριο καθ'όλη τη διάρκεια της προπτυχιακής, μεταπτυχιακής και διδακτορικής μου διατριβής, καθώς με εκπαίδευσε από την αρχή πάνω στις τεχνικές του εργαστηρίου, αλλά και για τη συνεχή υποστήριξη και υπομονή του όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα επίσης να του ευχηθώ να έχει γρήγορη εξέλιξη, καθώς πιστεύω πως έχει να προσφέρει πολλά στον τομέα της Μοριακής Ιολογίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους, αλλά και για τη φιλική τους διάθεση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αργύριο και Ελένη τόσο για την οικονομική, αλλά κυρίως για την ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

<b>1. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	- 1 -
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	- 3 -
1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	- 4 -
1.4 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΙΟΣΩΜΑΤΙΩΝ .....	- 6 -
1.5 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ .....	- 9 -
1.6 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	- 11 -
1.7 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	- 20 -
1.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	- 21 -
1.9 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	- 25 -
<b>2. 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3. 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>- 28 -</b>
3.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ .....	- 28 -
3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	- 28 -
3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΜΕΣΩ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΟΥ CCID <sub>50</sub> ..	- 28 -
3.4 ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ .....	- 30 -
3.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	- 30 -
.....	- 32 -
3.6 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ ΜΟΙ .....	- 32 -
3.7 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΔΥΟ ΚΛΩΝΟΥΣ .....	- 32 -
3.7.1 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΩΡΕΣ-	32 -
3.7.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ .....	- 33 -
3.7.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ .....	- 33 -
3.7.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	- 35 -
3.7.5 REAL-TIME PCR.....	- 36 -
3.7.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΝΥ .....	- 37 -
3.7.6.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΝΥ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ .....	- 37 -
3.7.6.2 PCR, ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	- 38 -

3.7.6.3	ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR .....	- 39 -
3.7.6.4	ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR .....	- 41 -
3.8	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	- 41 -
3.8.1	ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	- 41 -
3.8.2	ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	- 41 -
3.8.3	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA .....	- 42 -
3.8.4	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ .....	- 42 -
3.8.5	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΣΩ REAL-TIME PCR.....	- 43 -
3.9	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ ΣΤΟ ΙΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ... -	43 -
3.9.1	ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	- 43 -
3.9.2	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA .....	- 43 -
3.9.3	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΕΥΡΕΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΡΗΞΗΣ- 44	
	-	
3.9.4	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ .....	- 45 -
3.9.5	PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΡΗΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ .....	- 47 -
3.9.6	NESTED-PCR .....	- 49 -
3.9.7	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ .....	- 53 -
3.10	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ REAL TIME RT-LAMP ΜΕΘΟΔΟΥ.....	- 54 -
3.10.1	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ REAL TIME RT-LAMP .....	- 55 -
3.10.2	REAL TIME RT-LAMP .....	- 56 -
3.11	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΗΜΕΙΟΥ ΘΡΑΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ 5'UTR.....	- 58 -
3.12	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GC ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ 5'UTR ΚΑΙ 3'UTR -	59 -
4.	<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>- 60 -</b>
4.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ.....	- 60 -
4.1.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> .....	- 60 -

4.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID <sub>50</sub> .....	- 63 -
4.1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> .....	- 66 -
4.1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID <sub>50</sub> .....	- 69 -
4.1.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ENY.....	- 72 -
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	- 81 -
4.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ....	- 81 -
4.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID <sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	- 85 -
4.2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 <sup>6</sup> CCID <sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ....	- 89 -
4.2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID <sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	- 93 -
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ .....	- 95 -
4.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5' UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> ...	- 95 -
4.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5' UTR ΣΤΟ ECHO 12 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> .	- 96 -
4.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ SABIN 1 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> .....	- 97 -
4.3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ ECHO 12 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> .....	- 98 -
4.3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ SABIN 1 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> .....	- 99 -
4.3.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ ECHO 12 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> .....	- 100 -
4.3.7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3' UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> -	101 -
4.3.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3' UTR ΣΤΟ ECHO 12 [10 <sup>6</sup> ] CCID <sub>50</sub> -	103 -
4.3.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5' UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID <sub>50</sub> .	- 105 -
4.3.10 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5' UTR ΣΤΟ ECHO 12 [10] CCID <sub>50</sub> -	106 -
-	
4.3.11 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID <sub>50</sub> .....	- 107 -

4.3.12 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ ΕCHO 12 [10] CCID <sub>50</sub> ...	- 108 -
4.3.13 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID <sub>50</sub> .....	- 109 -
4.3.14 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ Ε12 [10] CCID <sub>50</sub> .....	- 110 -
4.3.15 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3'UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID <sub>50</sub> -	111 -
4.3.16 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3'UTR ΣΤΟ Ε12 [10] CCID <sub>50</sub> .....	- 112 -
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΑΣ REAL TIME RT-LAMP ΜΕΘΟΔΟΥ....	- 115 -
4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΘΡΑΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ 5'UTR.....	- 117 -
4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GC ΤΩΝ 2 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ 5'UTR και 3'UTR.....	- 121 -
<b>5. 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>- 123 -</b>
<b>6. 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>- 133 -</b>
<b>7. 7. ABSTRACT .....</b>	<b>- 147 -</b>
<b>8. 8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>- 151 -</b>

# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ**

Η ιστορία των Εντεροϊών αρχίζει μαζί με την ιστορία των Πολιοϊών, καθώς οι Πολιοϊοί αποτέλεσαν ορόσημο στη μελέτη των Εντεροϊών και γενικότερα στον τομέα της Ιολογίας (Pallansch, 2013). Η πολιομυελίτιδα, είναι η ασθένεια που προκαλείται από τους Πολιοϊούς και πιστεύεται πως είναι μία αρχαία ασθένεια, καθώς εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε μια αιγυπτιακή στήλη της 2<sup>ης</sup> χιλιετίας π.Χ. που απεικόνιζε ένα νεαρό με ατροφικό άκρο (Johnson, 1998). Οι πρώτες κλινικές περιγραφές της ασθένειας εντοπίζονται γύρω στο 1800, με αναφορές σε κρούσματα παράλυσης με παράλληλη εκδήλωση πυρετού. Η συνεισφορά των Von Heine το 1840 και Medin μεταγενέστερα, οδήγησαν στην ονομασία της πολιομυελίτιδας ως ασθένεια Heine-Medin. Ακόμη, οι Charcot και Joffroy, ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τις παθολογικές αλλαγές στους πρόσθιους κερατοειδείς κινητικούς νευρώνες της σπονδυλικής στήλης που προκαλούνται από την πολιομυελίτιδα (Pallansch, 2013).

Το 1900 ξεκίνησε μία νέα εποχή στην έρευνα για την πολιομυελίτιδα, με αποτέλεσμα τη σταδιακή κατανόηση της μολυσματικής φύσης της ασθένειας. Η συμβολή του Wickman στην ανακάλυψη του μηχανισμού μετάδοσης της ασθένειας, της σημασίας της μετάδοσης από ασυμπτωματικά μολυσμένα άτομα στον υπόλοιπο πληθυσμό, καθώς και της σημασίας της μόλυνσης του εντέρου στην παθογένεια της ασθένειας, ήταν καθοριστική (Pallansch, 2013). Λίγο αργότερα, ο Trask επιβεβαίωσε το ρόλο του γαστρεντερικού σωλήνα στην είσοδο και εξάπλωση του ιού που προκαλεί την πολιομυελίτιδα (Trask, Vignec, & Paul, 1938).

Παρά την αρχική πρόοδο που είχε σημειωθεί όμως, υπήρξε ένα διάστημα κατά το οποίο οι έρευνες έμειναν στάσιμες εξαιτίας κάποιων παραβλέψεων και λανθασμένων αντιλήψεων που είχαν επικρατήσει. Οι αντιλήψεις αυτές υποστήριζαν ότι ο ιός ήταν αποκλειστικά νευροτρόπος, ότι η κύρια οδός εισόδου του ιού στο ΚΝΣ ήταν μέσω του ρινοφάρυγγα και ότι ο ιός εξαπλώνονταν στο νευρικό σύστημα πριν την ιαμία και μέσω του οσφρητικού νεύρου. Έτσι, επικράτησε ένα κλίμα απαισιοδοξίας σχετικά με τον έλεγχο της ασθένειας για ένα διάστημα. Κάποια χρόνια αργότερα όμως, η ανακάλυψη ότι ο ιός εισέρχονταν μέσω της στοματογαστρικής οδού και ότι η μόλυνση του ΚΝΣ ακολουθούσε



την ιαμμία ήταν αρκετή για να αναγεννήσει τις ελπίδες για αποτελεσματική ανοσοποίηση (Bodian, 1955).

Ο Enders, βασιζόμενος σε μελέτες άλλων ερευνητών διεξήγαγε μία κομβική μελέτη τόσο για την ασθένεια της πολιομυελίτιδας και τους Πολιοϊούς, όσο και για ολόκληρο τον τομέα της Ιολογίας (Enders, Weller, & Robbins, 1949). Η μελέτη αυτή αποδείκνυε ότι ο γνωστός μέχρι τότε υπεύθυνος για την πολιομυελίτιδα Πολιοϊός, είχε την ικανότητα να αναπαραχθεί σε μη-νευρική καλλιέργεια κυττάρων. Οι επιπτώσεις αυτής της μελέτης είχαν αντίκτυπο σε ολόκληρο τον τομέα της Ιολογίας, καθώς έδειχναν πρωτίστως ότι ο Πολιοϊός αναπτύσσονταν σε καλλιέργειες κυττάρων που δεν αντιστοιχούν με τους ιστούς που μολύνονταν κατά τη διάρκεια της ασθένειας και επιπλέον, ότι ο Πολιοϊός προκαλούσε κυτταρική καταστροφή εμφανίζοντας χαρακτηριστική κυτταροπαθογόνο δράση. Στη συνέχεια, τεστ οροεξουδετέρωσης έδειξαν ότι ο Πολιοϊός έχει τρεις οροτύπους (Bodian, Morgan, & Howe, 1949).

Η συνεχής έρευνα πάνω στους Πολιοϊούς, έφερε σημαντικές αλλαγές στον τομέα της Μοριακής Ιολογίας. Πιο συγκεκριμένα, το γονιδίωμα των Πολιοϊών ήταν το πρώτο που αρχικά κλωνοποιήθηκε και στη συνέχεια αλληλουχήθηκε πλήρως όσον αφορά τους ζωικούς ιούς (Kitamura et al., 1981; Racaniello & Baltimore, 1981b) και επιπλέον, αποτέλεσε το πρώτο ιικό RNA, από το οποίο δημιουργήθηκε ένας μολυσματικός κλώνος RNA (Racaniello & Baltimore, 1981a). Επιπρόσθετα, ο Πολιοϊός αποτέλεσε και τον πρώτο ανθρώπινο ιό ο οποίος αποτυπώθηκε σε τρισδιάστατη μορφή μέσω κρυσταλλογραφίας χρησιμοποιώντας ακτίνες Χ (Hogle, Chow, & Filman, 1985). Πολύ σημαντική ανακάλυψη αποτέλεσε και ο προσδιορισμός του υποδοχέα των Πολιοϊών PVR ή CD155 από τον Mendelshon το 1989 (Mendelsohn, Wimmer, & Racaniello, 1989). Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που έφεραν τον υποδοχέα PVR, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης (Koike et al., 1991; Ren, Costantini, Gorgacz, Lee, & Racaniello, 1990).

Οι ιοί Cocksackie A, οι οποίοι ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών, απομονώθηκαν για πρώτη φορά από ένα ξέσπασμα επιδημίας της πολιομυελίτιδας στην περιοχή Cocksackie της Νέας Υόρκης από περιπτώματα ενός νεαρού αγοριού που είχε εμφανίσει οξεία χαλαρή παράλυση (Dalldorf & Sickles, 1948). Αυτά τα απομονωμένα στελέχη ελήφθησαν μέσω εμβολιασμού σε ποντίκια που βρίσκονταν σε περίοδο θηλασμού, τα οποία μετά τη μόλυνση εμφάνισαν εντελώς διαφορετικά συμπτώματα από αυτά που προκαλούν οι Πολιοϊοί. Κατά συνέπεια λοιπόν, η παθογένεια στα ποντίκια διαφοροποίησε αυτούς τους ιούς από εκείνους της πολιομυελίτιδας. Τον επόμενο χρόνο, απομονώθηκαν για πρώτη φορά ιοί

Coxsackie B, από περιπτώσεις ασθενών άσηπτης μηνιγγίτιδας (Joseph L. Melnick, Shaw, & Curnen, 1949).

Οι ιοί Coxsackie χωρίζονται σε υποκατηγορίες A και B βασιζόμενοι στην παθογένεια που προκαλούν σε θηλάζοντα ποντίκια. Οι Coxsackie A ιοί (CVA) κυρίως προκαλούν χαλαρή παράλυση στα άκρα των νεογέννητων ποντικιών εξαιτίας της εκτεταμένης λοίμωξης του μυοσκελετικού συστήματος, ενώ οι Coxsackie B ιοί (CVB) συνήθως προκαλούν από ήπια έως και πολύ σοβαρά συμπτώματα που μπορεί να οδηγήσουν και σε θάνατο επηρεάζοντας την καρδιά, το ΚΝΣ και το πάγκρεας. Οι CVBs είναι η πιο κοινή αιτία πρόκλησης οξείας μυοκαρδίτιδας και είναι επίσης υπεύθυνοι για πάνω από το 85% των περιπτώσεων άσηπτης μηνιγγίτιδας στα παιδιά (Whitton, Cornell, & Feuer, 2005).

Το 1951 ιοί Echo, οι οποίοι ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών απομονώθηκαν για πρώτη φορά από κόπρανα ασυμπτωματικών ατόμων. Ονομάστηκαν έτσι επειδή ήταν προϊόντα εντερικής απομόνωσης και προκαλούσαν κυτταροπαθογόνο δράση σε καλλιέργειες ιστών, απομονωμένα από ανθρώπους και ορφανά (μη σχετιζόμενα με κάποια γνωστή ασθένεια). Συστηματικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι Echo ιοί είναι υπεύθυνοι για αρκετές ασθένειες στον άνθρωπο.

Μετά από αυτήν την περίοδο ταχείας αύξησης του αριθμού των Εντεροϊών, υπήρξαν αρκετές δεκαετίες όπου νέοι Εντεροϊοί εντοπίστηκαν, αλλά δεν μπορούσαν όλοι να ταξινομηθούν στις μέχρι τότε γνωστές ομάδες. Αυτό άλλαξε με την ανάπτυξη των μεθόδων μοριακής ανίχνευσης και τα τελευταία 15 χρόνια παρατηρήθηκε ταχεία επέκταση του αριθμού των αναγνωρισμένων Εντεροϊών. Αυτή η περίοδος ανακάλυψης βρίσκεται ακόμη και σήμερα σε εξέλιξη (Pallansch, 2013).

## 1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι Εντεροϊοί είναι μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* και ανήκουν στο γένος *Enterovirus*. Είναι μη ελντροφόροι ιοί, που προστατεύονται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+) ssRNA, μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Η οικογένεια των ιών Picorna, εκτός από τους Εντεροϊούς, περιλαμβάνει και άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως είναι οι Πολιοϊοί, ο ιός της ηπατίτιδας A, οι Ρινοϊοί και ο FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα αυτής της

οικογένειας ιών, υποδηλώνει το μικρό τους μέγεθος (pico), καθώς και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος το οποίο αποτελεί το ιικό τους γονιδίωμα (RNA) (Fields et al., 2013).

### 1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η οικογένεια *Picornaviridae* απαρτίζεται από 68 γένη, σύμφωνα με τη νέα εγκεκριμένη ταξινόμηση από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV), η οποία ανανεώθηκε το Μάρτιο του 2021 (Zell et al., 2017).

<i>Aalivirus</i>	<i>Ailurivirus</i>	<i>Ampivirus</i>	<i>Anativirus</i>
<i>Aphovirus</i>	<i>Aquamavirus</i>	<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avisivirus</i>
<i>Boosepivirus</i>	<i>Bopivirus</i>	<i>Caecilivirus</i>	<i>Cardiovirus</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Crahelivirus</i>	<i>Crohivirus</i>	<i>Danipivirus</i>
<i>Dicipivirus</i>	<i>Diresapivirus</i>	<b>Enterovirus</b>	<i>Erbovirus</i>
<i>Felipivirus</i>	<i>Fipivirus</i>	<i>Gallivirus</i>	<i>Gruhelivirus</i>
<i>Grusopivirus</i>	<i>Harkavirus</i>	<i>Hemipivirus</i>	<i>Hepatovirus</i>
<i>Hunnivirus</i>	<i>Kobuvirus</i>	<i>Kunsagivirus</i>	<i>Lipnipivirus</i>
<i>Livupivirus</i>	<i>Ludopivirus</i>	<i>Malagasivirus</i>	<i>Marsupivirus</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Mischivirus</i>	<i>Mosavirus</i>	<i>Mupivirus</i>
<i>Myrropivirus</i>	<i>Orivirus</i>	<i>Oscivirus</i>	<i>Parabovirus</i>
<i>Parechovirus</i>	<i>Pasivirus</i>	<i>Paserivirus</i>	<i>Pemapivirus</i>
<i>Poecivirus</i>	<i>Potamipivirus</i>	<i>Pygoscepivirus</i>	<i>Rabovirus</i>
<i>Rafivirus</i>	<i>Rajidapivirus</i>	<i>Rohelivirus</i>	<i>Rosavirus</i>
<i>Sakobuvirus</i>	<i>Salivirus</i>	<i>Sapelovirus</i>	<i>Ssenecavirus</i>
<i>Shanbavirus</i>	<i>Sicinivirus</i>	<i>Symapivirus</i>	<i>Teschovirus</i>

**Πίνακας 1.3.1:** Συγκεντρωτικός πίνακας των 68 γενών της οικογένειας *Picornaviridae*.

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται με βάση τις ομοιότητες που εμφανίζουν όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, την αλληλουχία, καθώς και την οργάνωση του γενώματος τους [Knipe & Howley, 2007]. Το γένος των Εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό όσον αφορά τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο. Αρχικά, αποτελούνταν από μέλη που κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες: Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), ιοί Cocksackie A (CVA, ορότυποι 1-24), ιοί Cocksackie B (CVB, ορότυποι 1-6) και ιοί Echo (E, ορότυποι 1-33 (Fields et al., 2013). Όμως με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι Εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 15 πλέον διακριτά είδη με πολλαπλούς οροτύπους το καθένα.

Γένος Εντεροϊών	Ορότυποι
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	63
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	20
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus I</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Enterovirus K</i>	2
<i>Enterovirus L</i>	1
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	57

Κάθε ορότυπος σχετίζεται με την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και σε μικρότερη κλίμακα, το φάσμα συμπτωμάτων της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί βάσει των ασθενειών έχουν μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των Εντεροϊών σε Πολιοϊούς, ιούς Cocksackie A ή B και σε ιούς Echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική τους ενεργότητα και νόσο που προκαλούνταν από την εκάστοτε κατηγορία. Ανάμεσα σε αυτές τις ομάδες, οι ιοί μπορούν να διαχωριστούν βάσει της αντιγονικότητας τους, όπως αυτή καθορίζεται με την βοήθεια αντί-ορών (Fields et al., 2013).

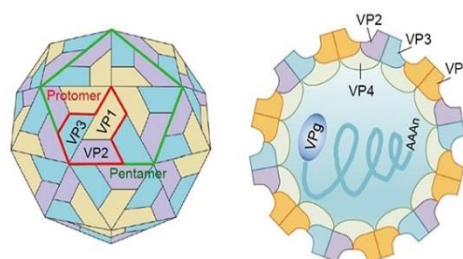
**Πίνακας 1.3.2:** Νέα ταξινόμηση Εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποι τους.

Οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις που προσδιορίζουν τον ορότυπο όμως, γίνονταν όλο και πιο περίπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Έτσι, ο διαχωρισμός μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται με την ανακάλυψη νέων ιών που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με τους ήδη γνωστούς οροτύπους. Παρά τους

περιορισμούς αυτούς όμως, ο ορότυπος παραμένει ακόμα και σήμερα μια ιδιότητα που διαφοροποιεί τους Εντεροϊούς (Fields et al., 2013). Πλέον, οι νέοι Εντεροϊοί ταξινομούνται με χρονολογική σειρά χαρακτηρίζοντάς τους με έναν αύξοντα αριθμό (EV-X 68-121), όπου X το γράμμα της ομάδας στην οποία ανήκουν.

## 1.4 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΙΟΣΩΜΑΤΙΩΝ

Τα ιοσωμάτια των Εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Έχουν απλή οργάνωση καθώς αποτελούνται αποκλειστικά από ένα περίβλημα-καψίδιο πρωτεϊνικής φύσης, το οποίο περιβάλλει το γυμνό RNA τους. Τα καψίδια των Εντεροϊών, σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση τεσσάρων πρωτεϊνών: VP1, VP2, VP3 και VP4 που εντοπίζονται σε 60 αντίγραφα. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και



**Εικόνα 1.4.1:** Δομή ενός ιού Picorna (Yi, Shin, Kim, Kim, & Chang, 2017).

Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών (Caspar & Klug, 1962), ο πιο σωστός τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα περίβλημα με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ένα εικοσάεδρο είναι ένα στερεό σώμα που αποτελείται από είκοσι τριγωνικές πλευρές και δώδεκα κορυφές. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μίας τέτοιας δομής, είναι 60.



Axis of rotational symmetry

5-fold



3-fold



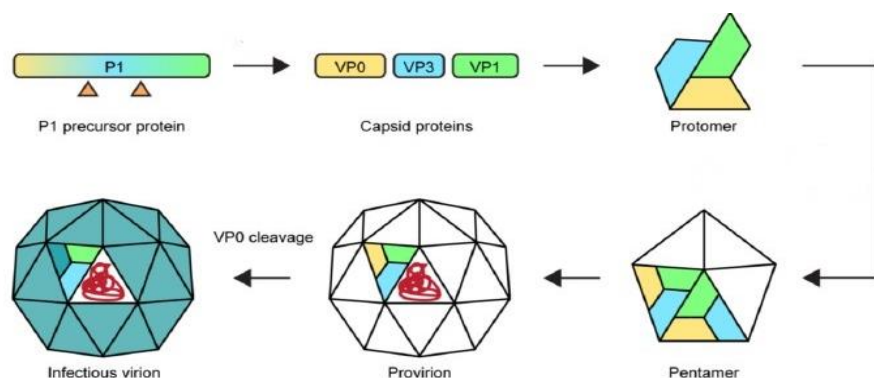
2-fold

**Εικόνα 1.4.2:**

Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο (Rueckert, Dunker, & Stoltzfus, 1969).

Σε ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, εντοπίζονται 3 άξονες συμμετρίας. Στο κέντρο, εντοπίζεται ο πενταμερής άξονας συμμετρίας (5X), ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Αποτελέσματα που προέκυψαν από βιοχημικές μελέτες και μελέτες περίθλασης ακτίνων X και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους, οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα καψίδια των Εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες με εικοσαεδρική συμμετρία (Rueckert et al., 1969).

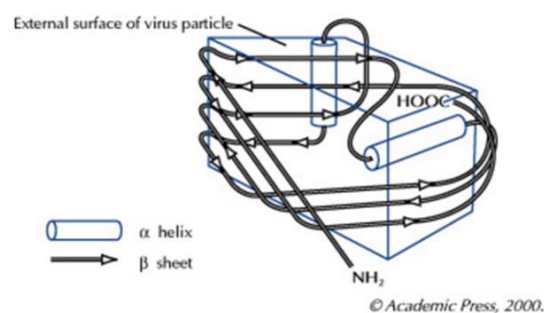
Βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο αποτελείται από ένα αντίγραφο κάθε δομικής πρωτεΐνης VP1, VP2, VP3 και VP4. Η Βασική δομική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι το πενταμερές, το οποίο προκύπτει από τη συνένωση πέντε πρωτομερών, με αποτέλεσμα να περιέχει πέντε αντίγραφα από την κάθε δομική πρωτεΐνη. Κατά τη διαδικασία συναρμολόγησης του καψιδίου, ενώνονται δώδεκα



**Εικόνα 1.4.3:** Συναρμολόγηση καψιδίου (van der Linden, Wolthers, & van Kuppeveld, 2015).

καψιδίου, λαμβάνει χώρα στο προτελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των Εντεροϊών, όπου γίνεται η καψιδίωση του RNA των νεοσυντιθέμενων ιών και περιλαμβάνει τη διάσπαση της VP0 στις επιμέρους VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες. Στην τελική μορφή του καψιδίου οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται εξ'ολοκλήρου στο εσωτερικό (Stanway, 1990; van der Linden et al., 2015).

Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία ομολογία όσον αφορά την αλληλουχία τους, ωστόσο και οι τρεις έχουν την ίδια τοπολογία σχηματίζοντας ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Ουσιαστικά, αυτή η περιοχή είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα. Το ένα β'-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας και το δεύτερο, που εμφανίζει μια κάμψη στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον «τοίχο» όσο και το «πάτωμα» της γωνίας. Το συγκεκριμένο σχήμα διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό, σταθερό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου και συγκεκριμένα γύρω από τον πενταμερή άξονα. Το δίκτυο αυτό, δημιουργείται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4 και είναι καθοριστικό για την σταθερότητα του



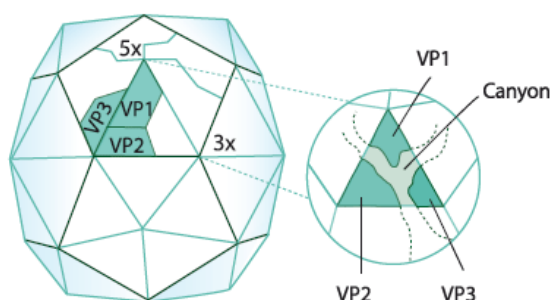
**Εικόνα 1.4.4:** Απεικόνιση του οκταπλού πλέγματος β'-βαρελίου (Fields, Knipe, & Howley, 2013).

ιοσωματίου. Η VP4 διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες καθώς εμφανίζει μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση. Πιο συγκεκριμένα, η VP4 προσομοιάζει στη θέση και τη διαμόρφωση με τις N-τελικές αλληλουχίες των VP1 και VP3, όμως λειτουργεί σαν αποσπώμενη N-τελική επέκταση της VP2, παρά σαν μια ανεξάρτητη πρωτεΐνη του περιβλήματος.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στο εξωτερικό του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIA και N-AgIIIB (Pfister T., 1999):

- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και απαρτίζεται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και απαρτίζεται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIA αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και από το 236 της VP2 και τα 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIB απαρτίζεται από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.

Αντιθέτως, τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται εσωτερικά του καψιδίου και δημιουργούν ένα πολύπλοκο δίκτυο με την VP4, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με το μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο (Pfister T., 1999).



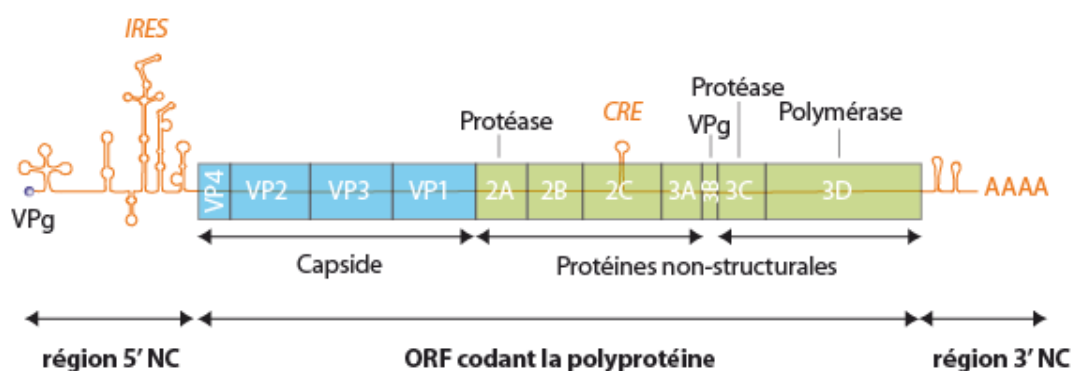
**Εικόνα 1.4.5:** Σχηματική αναπαράσταση της αύλακας (canyon) (Ehrenfeld, Domingo, & Roos, 2010).

Ως προς την επιφάνεια του ιοσωματίου, έπειτα από μελέτες ανάλυσης δομών, αποδείχτηκε πως χαρακτηρίζεται τόσο από προεξοχές, όσο και από αυλακώσεις. Μια χαρακτηριστική προεξοχή (plateau), αποτελεί εκείνη με σχήμα αστεριού, η οποία εντοπίζεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας. Από τις αυλακώσεις, η σημαντικότερη είναι μία βαθιά αυλάκωση που ονομάζεται canyon και

διαμορφώνεται στη σύνδεση της VP1 με τη VP3 περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας. Το canyon αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στους κυτταρικούς υποδοχείς του.

## 1.5 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το γενετικό υλικό των Εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Εξαιτίας της πολικότητας του (+), το RNA των Εντεροϊών αφού εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή, λειτουργεί απευθείας ως mRNA και μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιώντας τα κυτταρικά ριβοσώματα, με σκοπό να παραχθούν όλες οι ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του. Το γονιδίωμα των Εντεροϊών αποτελείται από τα ακόλουθα τέσσερα τμήματα: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) και την poly (A) ουρά, μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή (Fields et al., 2013).



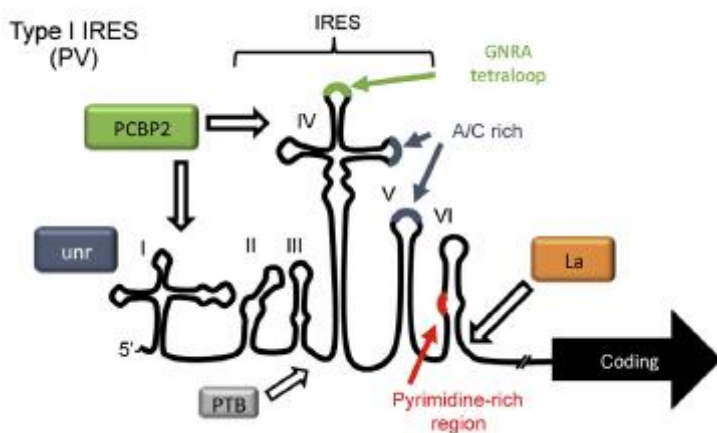
**Εικόνα 1.5.1:** Οργάνωση του γονιδιώματος των Εντεροϊών (Ehrenfeld et al., 2010).

Στο 5' άκρο του RNA των Εντεροϊών βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη η πρωτεΐνη Vpg (Virion Protein, genome linked)(Flanegan, Petterson, Ambros, Hewlett, & Baltimore, 1977; Lee, Nomoto, Detjen, & Wimmer, 1977). Αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει πως η Vpg δεν είναι απαραίτητη για να μπορέσει ένας Εντεροϊός να μολύνει ένα κύτταρο, καθώς αν αφαιρεθεί από το ιικό RNA με τη χρήση πρωτεάσης δεν παρατηρείται μείωση στη μολυσματικότητα του ιού. Η Vpg εντοπίζεται στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες RNA του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg αποτελεί εκκινητή για τη σύνθεση του RNA (Nomoto, Detjen, Pozzatti, & Wimmer, 1977; Pettersson, Ambros, & Baltimore, 1978).



Η 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) είναι εξαιρετικά συντηρημένη ανάμεσα στους Εντεροϊούς και συνίσταται από περιοχές σταθερά αναδιπλωμένου RNA συνδεδεμένες με περιοχές RNA που δεν έχουν συγκεκριμένη δόμηση (Siafakas, Markoulatos, & Stanway, 2002; Siafakas, Papaventsis, Levidiotou-Stefanou, Vamvakopoulos, &

Markoulatos, 2005). Η σωστή αναδίπλωση και κατά συνέπεια λειτουργία της 5'UTR, υποδεικνύει την ικανότητα του ιού να πολλαπλασιάζεται αποτελεσματικά και να μολύνει εν συνεχεία περεταίρω κύτταρα (Mahmud, Horn, & Tarrich, 2019). Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος, περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του ιικού γενώματος. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει μία τύπου 1 εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου



**Εικόνα 1.5.2:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής IRES (Cathcart, 2014).

(IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNAs με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα (Racaniello, 2013).

Βιοχημικές μελέτες σε μολυσμένα από Πολιοϊούς κύτταρα, απέδειξαν την ύπαρξη ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA των Εντεροϊών, το οποίο στη συνέχεια επεξεργάζεται για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (Summers & Maizel, 1968). Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των Πολιοϊών (Kitamura et al., 1981).

Όσον αφορά την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR), έχει μικρό μέγεθος περίπου 72-100 νουκλεοτίδια και φέρει μία δευτεροταγή δομή η οποία εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA (Jacobson, Konings, & Sarnow, 1993). Η 3'UTR αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι αναγκαία για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste et al., 2006). Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των Εντεροϊών φέρουν μια πολύ(A) ουρά στο 3' άκρο τους (Yogo & Wimmer, 1972). Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους της πολύ(A) ουράς, είναι ότι κατά τη διαδικασία της αντιγραφής χρησιμεύει ως μήτρα για την καταλυόμενη ουριδυλίωση της Vpg πρωτεΐνης από την 3D RNA πολυμεράση. Η διαδικασία αυτή προετοιμάζει την έναρξη της αντιγραφής του ιικού RNA. Στους ιούς Picorna, η πολύ(A)

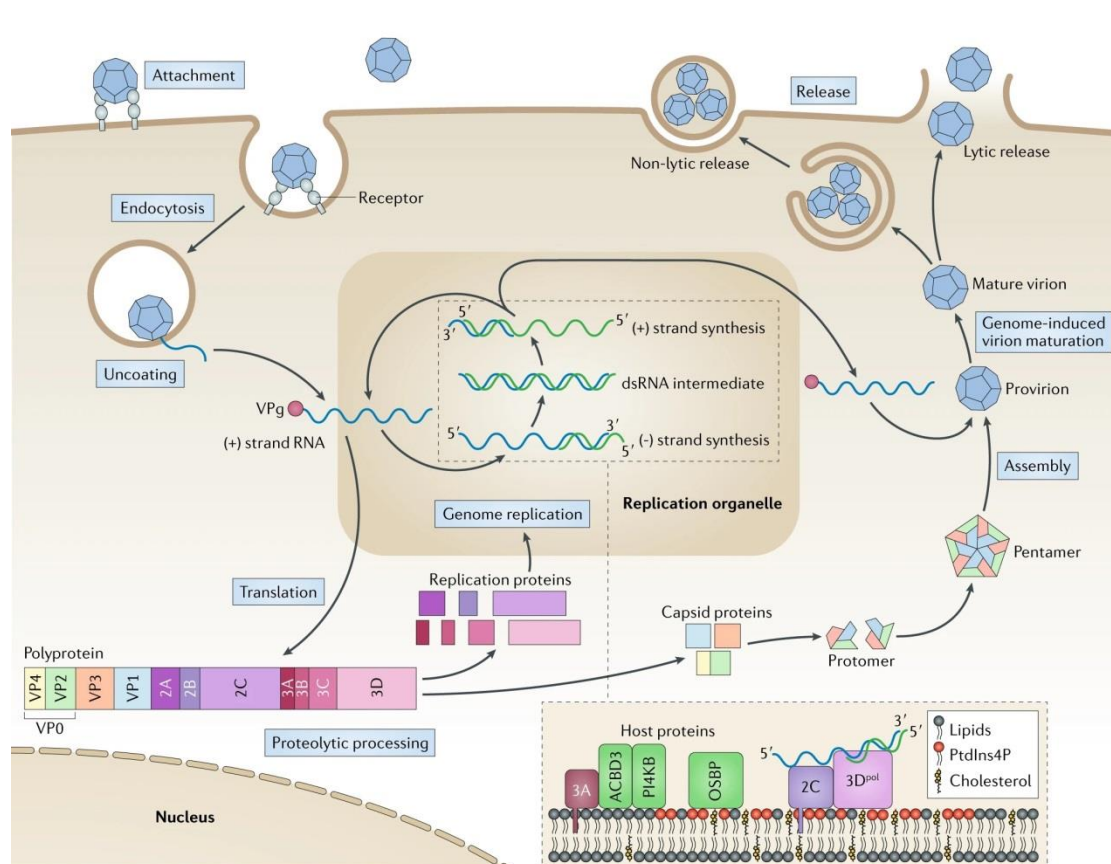
ουρά μαζί με την αλληλουχία της 3'UTR είναι ειδικές για κάθε γένος (Martínez-Salas, 2008; Svitkin, Costa-Mattioli, Herdy, Perreault, & Sonenberg, 2007). Στους Πολιοϊούς η πολύ(Α) ουρά δεν προστίθεται από την πολυμεράση, αλλά κωδικοποιείται από το γενετικό τους υλικό. Πολιοϊοί με λιγότερες από 8 Α στην πολύ(Α) ουρά αποτυγχάνουν να συνθέσουν αρνητικό κλώνο in-vitro (Sean & Semler, 2008).

## 1.6 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι Εντεροϊοί ξεκινούν και ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Πρώτο βήμα αποτελεί η πρόσδεση του ιού στον κατάλληλο κυτταρικό υποδοχέα. Ακολουθούν η είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή μέσω της διαδικασίας της ενδοκύτωσης και η απέκδυση του ιικού γενώματος κατά την οποία το ιικό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα έπειτα από δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Το γονιδίωμα των Εντεροϊών, ως μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας λειτουργεί απευθείας ως mRNA μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται από τα κυτταρικά ριβοσώματα. Αποτέλεσμα της μετάφρασης είναι μία πολυπρωτεΐνη, η οποία αυτό-τεμαχίζεται και έτσι προκύπτουν τόσο οι δομικές, όσο και οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μία από τις λειτουργικές πρωτεΐνες που παράγονται είναι η 3D ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία καταλύει το στάδιο της αντιγραφής του ιού. Η αντιγραφή πραγματοποιείται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε μεμβρανικά κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Απαραίτητο βήμα για να μπορέσει ένας Εντεροϊός να αντιγραφεί, είναι η μετατροπή του γονιδιώματός του στο συμπληρωματικό μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας, το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Ένα μέρος των νεοσυντιθέμενων (+) RNA κλώνων που θα προκύψουν, θα χρησιμοποιηθεί ως mRNA επιστρέφοντας στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί εκ νέου. Ένα άλλο τμήμα θα επιστρέψει πίσω στη διαδικασία της αντιγραφής και ένα μέρος θα αποτελέσει το γένωμα των νέων ώριμων πλέον ιικών σωματιδίων. Αφού λοιπόν γίνει η σύνθεση του καψιδίου από τις δομικές πρωτεΐνες, ακολουθεί η καψιδίωση του ιού και η έξοδος του από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου (Racaniello, 2013).

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός Εντεροϊού ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστή και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης (Racaniello, 2013).

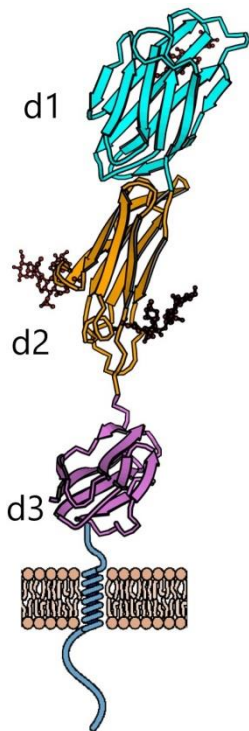
Τα στάδια του κύκλου ζωής που αναφέρθηκαν πιο πάνω περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια:



**Εικόνα 1.6.1:** Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των Εντεροϊών (Baggen, Thibaut, Strating, & van Kuppeveld, 2018).

### A. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο

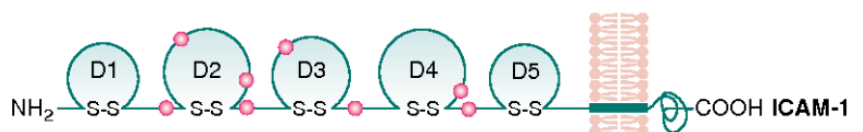
Ο κύκλος ζωής των Εντεροϊών αρχίζει με την πρόσδεση του ιού στον κατάλληλο κυτταρικό υποδοχέα του ξενιστή. Οι Εντεροϊοί, χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και γλυκολιπίδια. Στην πλειοψηφία τους οι Εντεροϊοί συνδέονται στους υποδοχείς τους μέσω αλληλεπίδρασης των συντηρημένων αμινοξέων των καψιδιακών πρωτεϊνών VP1 και VP3, στο σημείο που σχηματίζουν την αύλακα(canyon) (Rossmann et al., 2002).



Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει ποιά κύτταρα μπορεί να μολύνει κάθε ιός, δηλαδή τον τροπισμό του και εν μέρει, την παθογόνο δράση του, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Για τους ευρέως μελετημένους Πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των Πολιοϊών αποκάλυψε ότι πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραματικών διεργασιών έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι εκείνη που εμπεριέχει τη θέση σύνδεσης με τους Πολιοϊούς (Koike et al., 1991; Racaniello & Baltimore, 1981a). Μοντέλα συμπλόκων Πολιοϊών-PVR που προέκυψαν από δεδομένα κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η πρώτη περιοχή είναι αυτή που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ιού (Belnap et al., 2000).

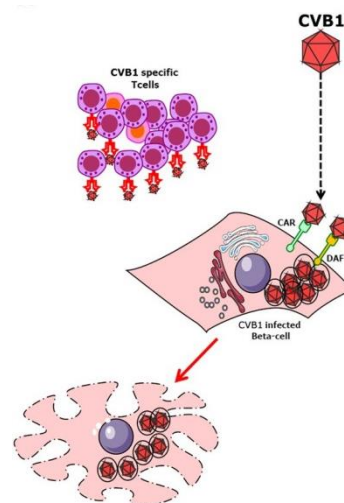
**Εικόνα 1.6.2:** Μοντέλο του PVR, όπου φαίνονται οι 3 Ig-like περιοχές (Belnap et al., 2000).

Ορισμένα μέλη των Εντεροϊών της ομάδας C, όπως για παράδειγμα οι ιοί Coxsackie A (CVA 13,17,20,21,24), χρησιμοποιούν τον υποδοχέα ICAM-1 ή αλλιώς CD54 για την είσοδό τους στο κύτταρο ξενιστή (Racaniello & Baltimore, 1981a). Ο υποδοχέας αυτός είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών και εντοπίζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.



**Εικόνα 1.6.3:** Απεικόνιση του ICAM-1 υποδοχέα (Rossmann, He, & Kuhn, 2002).

Αντίστοιχα, οι περισσότεροι Εντεροϊοί της ομάδας Β χρησιμοποιούν τα ευρέως διαθέσιμα μόρια DAF (decay-accelerating factor) και CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) για να εισέλθουν στα κύτταρα ξενιστές τους (Marjomäki, Turkki, & Huttunen, 2015). Κάποια μέλη των Εντεροϊών της ομάδας Β, όπως είναι για παράδειγμα οι ιοί Coxsackie B (B1-B6) χρησιμοποιούν τον υποδοχέα CAR, ενώ ορισμένοι Echo ιοί όπως (E6, E7, E11, E12, E13, E20, E21, E29, E33) χρησιμοποιούν τον υποδοχέα DAF. Τον υποδοχέα DAF μπορούν να χρησιμοποιήσουν επίσης οι ιοί Coxsackie B1,B3,B5 (Dotta & Sebastiani, 2014).



**Εικόνα 1.6.4:** Απεικόνιση της σύνδεσης του CVB1 με τους υποδοχείς DAF και CAR στα β-λεμφοκύτταρα (Dotta & Sebastiani, 2014).

Η αλληλεπίδραση ενός Εντεροϊού με τον υποδοχέα του, προκαλεί σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που σχηματίζονται μετά την αλληλεπίδραση, ονομάζονται altered ή A σωματίδια και περιέχουν το ιικό RNA έχοντας χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, η N-τελική περιοχή της VP1, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, εντοπίζεται στην επιφάνεια των σωματιδίων A (Fricks & Hogle, 1990). Η συγκεκριμένη αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και τα σωματίδια A παρουσιάζουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταβεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν το RNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Σίγουρα όμως η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του ιού, καθώς οι αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση είναι αυτές που οδηγούν στην απέκδυσή του (Racaniello, 2013).

Δεν έχει διευκρινιστεί εάν η πρωτεΐνη VP4, που απελευθερώνεται από το καψίδιο κατά το σχηματισμό των σωματιδίων A, εγκαταλείπει το κύτταρο ή συμβάλει στο σχηματισμό του πόρου. Έχει αποδειχτεί όμως ότι η VP4 απαιτείται στα αρχικά στάδια της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ένας ιός που φέρει μετάλλαξη στο 28<sup>ο</sup> αμινοξύ της VP4 μπορεί να συνδεθεί σε κύτταρα και να μετατραπεί σε σωματίδιο A, αλλά αναστέλλεται σε επακόλουθο στάδιο κατά την είσοδο του στο κύτταρο (Moscufo, Yafal, Rogove, Hogle, & Chow, 1993). Μεταλλάξεις στην ίδια θέση της VP4 φαίνεται ότι ελαττώνουν την αγωγιμότητα του πόρου και τη μετατόπιση του ιικού RNA, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η VP4 διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του πόρου (Racaniello, 2013).

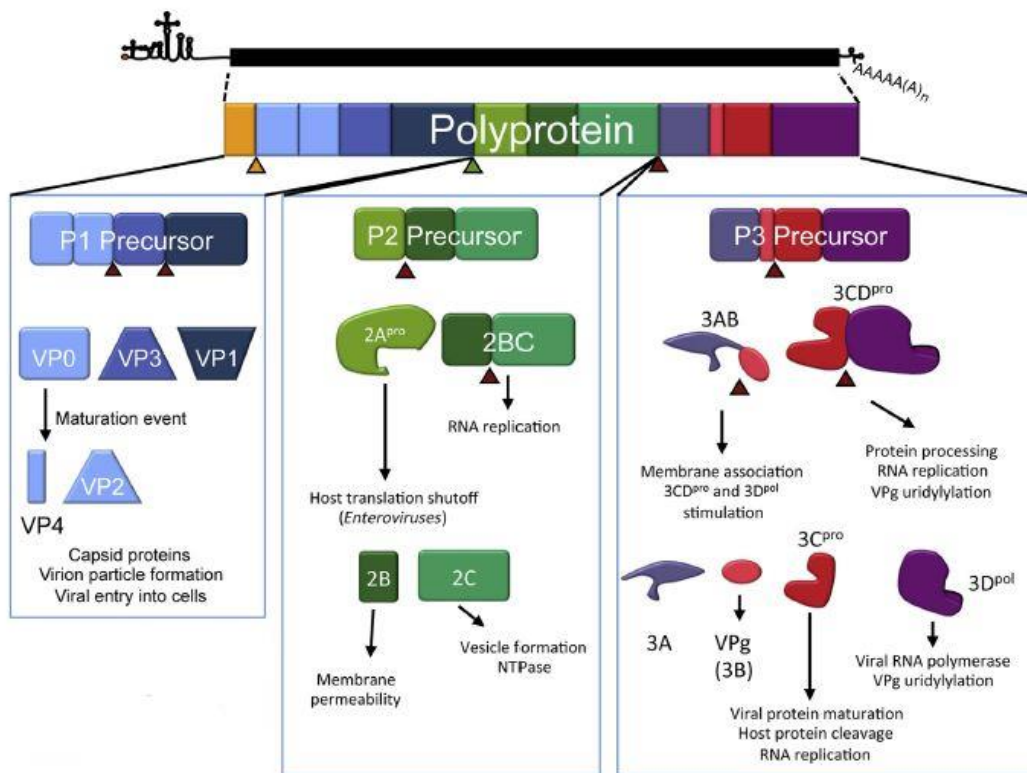
## **B. Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης**

Έπειτα από τη διαδικασία της απέκδυσης, το ιικό RNA θετικής πολικότητας που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή οδηγείται στα ριβοσώματα του ξενιστή ώστε να μεταφραστεί. Αυτό συμβαίνει καθότι είναι προαπαιτούμενο να παραχθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες για την αντιγραφή του ιού, αφού δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του RNA των Εντεροϊών είναι ότι δεν έχει δομές 5'-καλύπτρας (5'-CAP) στο 5' άκρο του, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία απομακρύνεται κατά την είσοδο του ιικού RNA στο κύτταρο ξενιστή (Ambros & Baltimore, 1980). Η 5' UTR στους Εντεροϊούς έχει μέγεθος περίπου 750 νουκλεοτίδια (Mahmud et al., 2019). Νουκλεοτιδική αλληλούχηση του θετικού κλώνου του Πολιοϊού, ο οποίος αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο ανάμεσα στους Εντεροϊούς, απέδειξε ότι η 5' UTR έχει μέγεθος 741 νουκλεοτίδια και περιέχει επτά AUG κωδικόνια (Kitamura et al., 1981; Racaniello & Baltimore, 1981a). Έτσι, διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία που προάγει τη σύνδεση με τη ριβοσωμική υπομονάδα. Η αλληλουχία αυτή, εξαιτίας της λειτουργίας της ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES (Internal Ribosome Entry Site).

Οι Εντεροϊοί, φέρουν τύπου I IRES. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται 50 με 100 νουκλεοτίδια πριν το 3'-άκρο του IRES. Η έναρξη της μετάφρασης μέσω του τύπου I IRES, περιλαμβάνει τη σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο IRES και την ανίχνευση του κωδικονίου έναρξης. Η 40S υπομονάδα μπορεί είτε να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, είτε να συνδεθεί μέσω στρατολόγησης στο IRES έπειτα από αλληλεπίδραση με μεταφραστικούς παράγοντες έναρξης, γνωστούς ως IRES trans-acting factors (ITAFs) (Mahmud et al., 2019).

Όλες οι απαραίτητες δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες των Εντεροϊών, παράγονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού μεγάλου ORF, που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και στη συνέχεια, ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (in cis) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες in cis ή in trans (διαμοριακές). Το γένωμα των Εντεροϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεϊνάσες: την 2Apro και την 3Cpro ή 3CDpro (Racaniello, 2013).





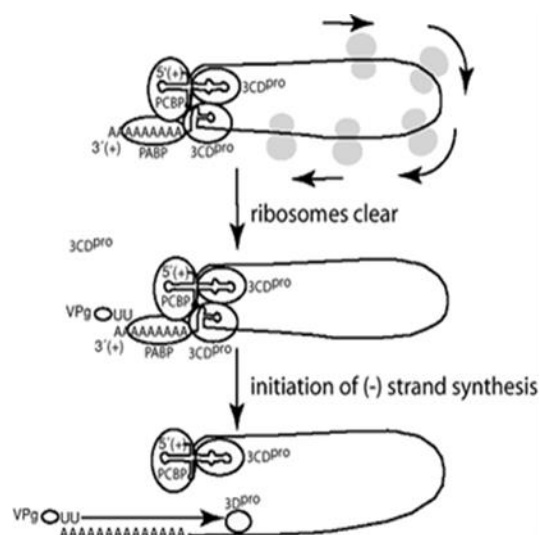
**Εικόνα 1.6.5:** Τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης (Cathcart, 2014).

Τόσο η 3C<sub>pro</sub> όσο και η 2A<sub>pro</sub> είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με διαδικασία αυτό-τεμαχισμού. Μόλις απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Σε μολυσμένα κύτταρα με Εντεροϊούς, το αρχικό γεγονός είναι η απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2A<sub>pro</sub>. Στη συνέχεια, η 3CD<sub>pro</sub> απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο μέσω αυτοκαταλυτικού τεμαχισμού. Αυτή η πρωτεάση, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον Πολιοϊό τύπου 1 πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με την 3C<sub>pro</sub>. Τόσο η 3C<sub>pro</sub> όσο και η 3CD<sub>pro</sub> επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* από την 3CD<sub>pro</sub>, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C<sub>pro</sub>, 3D<sub>pol</sub> και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3D<sub>pol</sub> αλληλουχία μέσα στην 3CD<sub>pro</sub> απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας τη δραστηρική επεξεργασία από το 3C<sub>pro</sub> μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά τη συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν με αυτοκαταλυτικό μηχανισμό, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Σημαντικό πλεονέκτημα της

στρατηγικής αυτής είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί, τόσο από το ρυθμό όσο και την έκταση την πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών διαφορετικής δραστηριότητας (Racaniello, 2013).

### Γ. Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή των Εντεροϊών ξεκινάει αρκετά γρήγορα (περίπου 1,5-2 ώρες) μετά την είσοδό τους στο κύτταρο ξενιστή (Baltimore & Girard, 1966). Πραγματοποιείται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ικό RNA. Αναλυτικότερα, τα σύμπλοκα απαρτίζονται από ικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D<sup>pol</sup>, η 2C<sup>ATPase</sup>, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB, καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Μέρος του συμπλόκου αποτελεί και το ικό RNA, που περιέχει cis-acting δομές όπως το “cloverleaf” που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. Η δομή “cloverleaf” είναι αυτή που αναγνωρίζεται από τους ITAFs που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως η PCBP2 και από την ική RNA πολυμεράση ώστε να μπορέσει να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού (Mahmud et al., 2019). Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε μεμβρανικά κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Egger & Bienz, 2002; Egger, Teterina, Ehrenfeld, & Bienz, 2000). Οι ικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, είναι αυτές



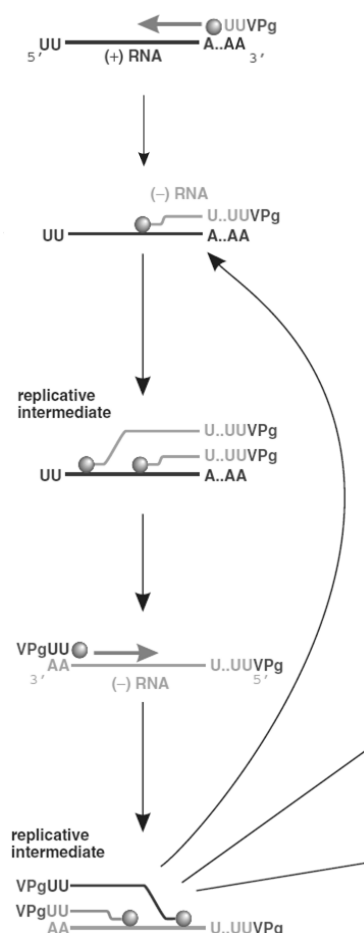
που φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη η οποία αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στη μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3Dpol και την 3CDpro, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να συμβάλει στην αγκυροβόληση του ιικού RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής (Echeverri & Dasgupta, 1995).

**Εικόνα 1.6.6:** Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου (Racaniello, 2013).



Η διαδικασία της αντιγραφής των Εντεροϊών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Απαραίτητο βήμα όμως για να ξεκινήσει, αποτελεί η μετατροπή του θετικής πολικότητας RNA τους στο συμπληρωματικό RNA αρνητικής πολικότητας, το οποίο είναι αυτό που θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων θετικής πολικότητας (Murray & Barton, 2003). Ένα σχετικά απλό μοντέλο της αντιγραφής θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI → RNA(+), όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+).

Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη καθώς, η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών (Novak & Kirkegaard, 1991). Η ύπαρξη ασύμμετρης ποσότητας θετικού-αρνητικού κλώνου μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφοράς στη χρήση πρωτεϊνών ή ανάγκης νουκλεϊκών οξέων ανάμεσα στις δύο διαδικασίες. Για τη σύνθεση του θετικού κλώνου όλοι οι απαραίτητοι παράγοντες είναι έτοιμοι-διαθέσιμοι (Sean & Semler, 2008).

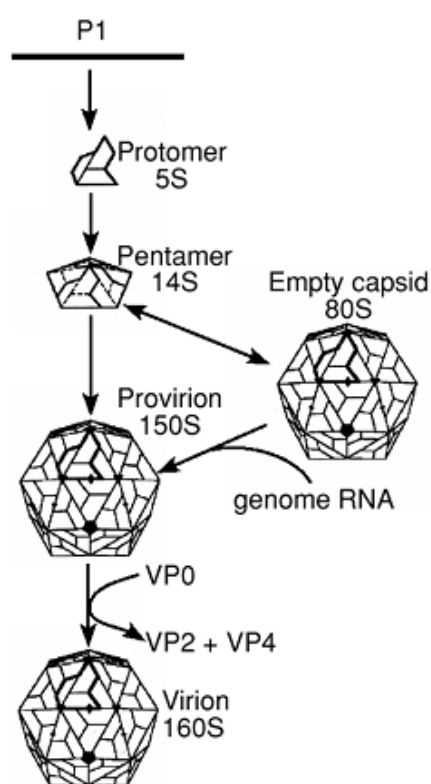


**Εικόνα 1.6.7:** Ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού RNA (Carter, 2013).

Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της αντιγραφής είναι η 3D RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA 3Dpol παράγεται έπειτα από τον τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης 3CDpro, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεάση, αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης. Η 3Dpol είναι ένα ένζυμο του οποίου η δράση εξαρτάται από την ύπαρξη εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* φάνηκε πως η 3Dpol δεν μπορεί να αντιγράψει το RNA των ιών χωρίς τη συμβολή ενός ολίγο(U) εκκινητή. Το ρόλο του εκκινητή στους Εντεροϊούς διαδραματίζει η πρωτεΐνη VPg, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η ουριδιλίωση της VPg πρωτεΐνης είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία σύνθεσης του RNA. Στη συνέχεια, η ουριδιλίωση επεκτείνεται ώστε να σχηματιστεί μία πολύ(U) αλληλουχία. Για την αποτελεσματική ουριδιλίωση της VPg είναι απαραίτητη μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element) το οποίο αποτελεί εκμαγείο για την πραγματοποίηση της διαδικασίας (Rieder, Paul, Kim, van Boom, & Wimmer, 2000; Sean & Semler, 2008; Yin, Paul, Wimmer, & Rieder, 2003).

Επομένως, το RNA των Εντεροϊών δε λειτουργεί αποκλειστικά ως mRNA, αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Ένας μηχανισμός που έχει προταθεί, υποστηρίζει ότι η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA είναι αυτή που ρυθμίζει πότε το RNA αντιγράφεται και πότε μεταφράζεται (Gamarnik & Andino, 1998). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PCBP) στη δομή αυτή, επάγει τη διαδικασία της μετάφρασης. Όταν η 3CDpro συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει τη μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά δεδομένα έχει αποδειχθεί ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα.

#### Δ. Καψιδίωση και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιωσωματίων



**Εικόνα 1.6.8:** Σχηματισμός του καψιδίου και καψιδίωση των ιών Picorna (Racaniello, 2013)

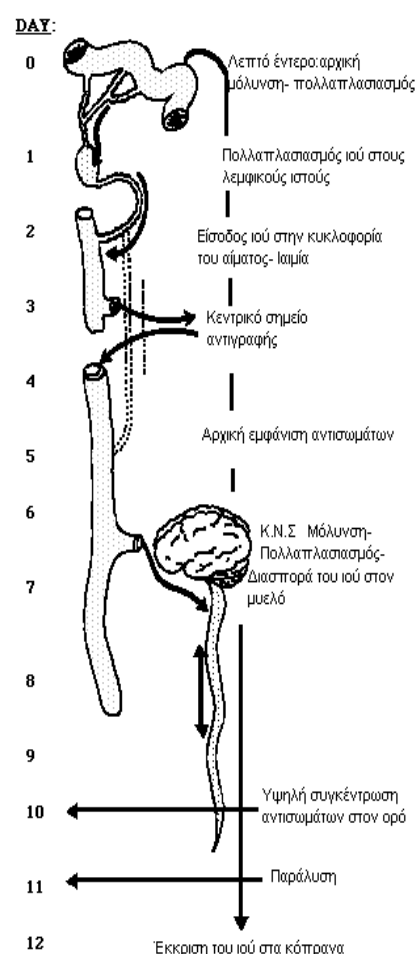
Κατά τη σύνθεση της πρωτεΐνης P1, η οποία είναι η πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών και οδηγούν έτσι στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεάση 3CDpro. Μέσω αυτής της επεξεργασίας παράγεται το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, η ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Στη συνέχεια, πέντε πρωτομερή ενώνονται για το σχηματισμό ενός πενταμερούς. Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεάση η οποία πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν είναι γνωστή ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσβάσιμος σε ιικές και κυτταρικές πρωτεάσες (Nomoto et al., 1977; Novak & Kirkegaard, 1991).

Η καψιδίωση των ιών Picorna είναι μία εξαιρετικά ειδική διαδικασία που περιλαμβάνει αποκλειστικά το πακετάρισμα των θετικών κλώνων και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA (Nomoto et al., 1977; Novak & Kirkegaard, 1991). Αρχικά, υπήρχε η υπόθεση ότι η VPg πρωτεΐνη ίσως να αποτελούσε σήμα πακεταρίσματος. Τελικά αποσαφηνίστηκε πως δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς ο αρνητικός κλώνος RNA που περιέχει την VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA.

Όσον αφορά την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι Εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης (Tucker, Thornton, Wimmer, & Compans, 1993)

## 1.7 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η μόλυνση με Εντεροϊούς ξεκινά από το πεπτικό σύστημα και η είσοδος τους γίνεται κυρίως από το στόμα. Αρχικά, οι Εντεροϊοί μολύνουν τις βλεννώδεις επιφάνειες του φάρυγγα και του εντέρου και στη συνέχεια τους τοπικούς λεμφαδένες ξεκινώντας τον πολλαπλασιασμό τους. Στη συνέχεια εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος (ιαιμία), όπου πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερο ρυθμό και τελικά πραγματοποιείται η μεταφορά τους σε πιο απομακρυσμένους λεμφικούς ιστούς ή άλλες περιοχές, που αποτελούν τα όργανα-στόχους. Η αντιγραφή του ιού σε αυτές τις δευτερογενείς θέσεις παράγει την δευτερογενή ή κύρια ιαίμια κατά την οποία ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα λόγω του μεγάλου ιικού φορτίου και τελικά είναι πιθανόν να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα, κάτι το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ανοσίας του ατόμου. Όλα αυτά περιγράφονται στο μοντέλο του Sabin, το οποίο αφορά την παθογένεια των Πολιοϊών, ωστόσο έχει εφαρμογή σε όλους τους ιούς Picorna. Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας είναι συνήθως 7 – 14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από



**Εικόνα 1.7.1:** Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των Πολιοϊών (Racaniello, 2013).

2 – 35 ημέρες σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση από κάποιον Εντεροϊό, υπάρχει έκκριση αυτού στα κόπρανα για 8 εβδομάδες. Επίσης, ο ιός είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών (J. L. Melnick, 1996; Palacios & Oberste, 2005).

Οι κλινικές εκδηλώσεις των Εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση πολύ σοβαρών ασθενειών όπως μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης (Kyriakopoulou et al., 2011; Siafakas, Markoulatos, & Levidiotou-Stefanou, 2004). Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπειτα από μόλυνση με Εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς (J. L. Melnick, 1996; Palacios & Oberste, 2005).

## **1.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ**

Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ποικιλομορφία των Εντεροϊών αλλά και για την εξέλιξη τους με το πέρασμα του χρόνου είναι δύο (Domingo & Holland, 1997):

- A. Οι μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του ιικού RNA
- B. Ο μοριακός ανασυνδυασμός

### **A. Μεταλλάξεις**

Η μοριακή βάση του υψηλού ρυθμού πρόκλησης μεταλλάξεων κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του ιικού RNA οφείλεται i) στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού, η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα  $10^3$  έως  $10^4$  νουκλεοτίδια και ii) στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των RNA λυτικών ιών (Wimmer, Hellen, & Cao, 1993). Οι πιο συχνά παρατηρούμενες μεταλλάξεις είναι οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι αυτή που

παρατηρείται πιο συχνά. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες (Figlerowicz, Alejska, Kurzyńska-Kokorniak, & Figlerowicz, 2003).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της εξέλιξης του γονιδιώματος των Εντεροϊών αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφορετικών περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του γονιδιώματος του ιού είναι οι περιοχές που κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3. Στις περιοχές αυτές εντοπίζεται υψηλός ρυθμός συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων εξαιτίας της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Έτσι, ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Pliaka et al., 2010). Εξαιρέση αποτελούν οι περιοχές που συμμετέχουν στην αναγνώριση και πρόσδεση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα, καθώς και οι περιοχές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων. Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι δεν εντοπίζονται εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης.

Επιπλέον, *cis-acting* γενετικά στοιχεία που συμμετέχουν στην αντιγραφή (cloverleaf και CRE) ή στην μετάφραση (IRES) του ιικού RNA, υφίστανται ακόμα λιγότερες μεταλλάξεις. Πιο αναλυτικά, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) σύμφωνα με το οποίο οι μεταλλάξεις αφορούν βάσεις που επιτρέπουν τη διατήρηση της δευτεροταγούς δομής τους, η οποία σχετίζεται άμεσα με την ορθή λειτουργία τους (Siafakas, Markoulatos, & Stanway, 2002).

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα μίας πληθώρας μελετών, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμα των Εντεροϊών αποτελεί μία συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα, δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες, οι λειτουργικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα από τις άλλες περιοχές του γονιδιώματος (Bolanaki et al., 2007; Kottaridi et al., 2007; Kottaridi, Bolanaki, Mamuris, Stathopoulos, & Markoulatos, 2006; A. N. Lukashev et al., 2003).

Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί είτε να μειώνει είτε να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη. Η εγκαθίδρυση μεταλλάξεων που προσδίδουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα είναι αποδεκτή στα πλαίσια της θετικής επιλογής του Δαρβίνου. Αντιθέτως, μεταλλάξεις που προσδίδουν επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται μέσω αρνητικής επιλογής (Domingo & Holland, 1997).

## **B. Ανασυνδυασμός**

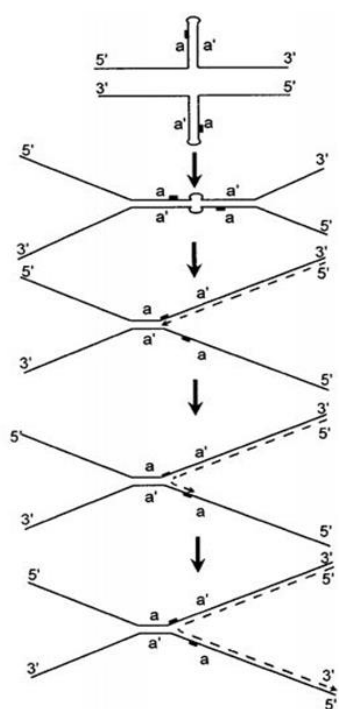
Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών περιγράφηκε πρωταρχικά για τους Πολιοϊούς το 1962 από τον Hirst. Αρχικά, επικρατούσε η άποψη ότι ο ανασυνδυασμός αποτελεί πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης συγκριτικά με τις μεταλλάξεις, καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός (Guillot et al., 2000). Επακόλουθες μελέτες όμως, αποσαφήνισαν ότι η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει με την ίδια συχνότητα με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή, καθώς επίσης ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού σχετίζεται με το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων και την απόσταση μεταξύ γενετικών δεικτών. Το 1988, ο King υπολόγισε ότι το 10-20% των ιικών γονιδιωμάτων υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού (Duggal, Cuconati, Gromeier, & Wimmer, 1997).

Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Συμβάλει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιικού RNA και συνεπώς βοηθάει στη διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Επιπλέον, συμμετέχει στη δημιουργία καλύτερα προσαρμοσμένων ιικών στελεχών για επιβίωση, όπως για παράδειγμα με μεγαλύτερη ικανότητά αντιγραφής στο γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει τη διαδικασία της εξέλιξης μέσω ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή ακόμα και μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (Wimmer et al., 1993).

Ο ανασυνδυασμός των RNA γονιδιωμάτων λαμβάνει χώρα σε κύτταρα στα οποία υπάρχει συν-μόλυνση με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου (homotypic) είτε διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) (Combélas, Holmblat, Joffret, Colbère-Garapin, & Delpeyroux, 2011; Kottaridi et al., 2007; Nikolaidis et al., 2019). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό: i) Ο αντιγραφικός μηχανισμός και ii) Ο μη αντιγραφικός μηχανισμός.

Ο βασικός μηχανισμός για να συμβεί ανασυνδυασμός είναι ο αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός αλλαγής μήτρας. Ονομάστηκε έτσι διότι σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA και ξαφνικά σταματά και συνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία σύνθεσης

του αρνητικού κλώνου από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού, το ένζυμο υπάρχει πιθανότητα να συναντήσει κάποιο εμπόδιο όπως για παράδειγμα μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας (Romanova et al., 1986), ή ένα λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο (Pilipenko, Gmyl, & Agol, 1995) και να σταματήσει τη σύνθεση του (-) RNA (Dedepsidis, Kyriakopoulou, Pliaka, & Markoulatos, 2010; Karakasiliotis, Markoulatos, & Katsorchis, 2004; Karakasiliotis, Paximadi, & Markoulatos, 2005).



**Εικόνα 1.8.1:** Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Agol, 1997).

Έτσι, η ιική 3D πολυμεράση αποδεσμεύεται μαζί με το νεοσυντιθέμενο κλώνο και μεταπηδά σε έναν άλλον RNA κλώνο θετικής πολικότητας, τον οποίο θα χρησιμοποιήσει πλέον ως μήτρα για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Ως αποτέλεσμα προκύπτει η δημιουργία χιμαιρικών μορίων. Όταν η μετάβαση από το ένα εκμαγείο στο άλλο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος (Kirkegaard & Baltimore, 1986), ενώ αντιθέτως όταν η μετάβαση δεν είναι ακριβής οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι αυτός που συναντάται στα περισσότερα βιώσιμα ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία έχουν ανασυνδυαστεί μέσα στην κωδική τους περιοχή, ενώ ο μη-ομόλογος παρατηρείται κυρίως σε μη κωδικές περιοχές του ιικού γονιδιώματος.

Το γεγονός ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των (-) RNA κλώνων, οφείλεται κατά κύριο λόγο σε δύο αιτίες. Πρωτίστως, η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+) RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-) RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-) RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία (Racaniello, 2013).

Ο μη-αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός ρήξης σε αντίθεση με τον προηγούμενο είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση δύο ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός με το 3' άκρο του άλλου μορίου (Agol, 1997). Υπάρχουν τρεις θεωρίες σχετικά με το πώς μπορούν να προκύψουν αυτά τμήματα RNA:

- i) μέσω πρόωρης λήξης της αντιγραφής,
- ii) μέσω αποικοδόμησης του ιικού RNA από RNases των κυττάρων,
- iii) μέσω δραστικότητας ριβοενζύμου του ίδιου του ιικού RNA (Agol, 2002)

Έπειτα, στη σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκεται είτε μία RNA λιγάση, είτε κάποια δραστικότητα ριβοενζύμου (Agol, 1997).

## 1.9 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Μελέτες της μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων προσφέρουν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες. Πιο συγκεκριμένα, για τους Εντεροϊούς μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συμβάλει στη βαθύτερη κατανόησή τους όσον αφορά την ταξινόμησή τους, στην προέλευση των κρουσμάτων καθώς και στην ταυτοποίηση των κυκλοφορούντων στελεχών. Έχει φανεί ότι οι Εντεροϊοί διαφέρουν στα επιδημιολογικά τους προφίλ. Ορισμένοι γενότυποι μπορεί να απομονώνονται σχεδόν κάθε χρόνο και χαρακτηρίζονται ενδημικοί τύποι, ενώ αντιθέτως οι λεγόμενοι επιδημικοί τύποι μπορεί να αποτελούν την πλειοψηφία των απομονώσεων για ένα χρόνο και μετά να «εξαφανίζονται» για μεγάλο χρονικό διάστημα (Alexander N. Lukashev, Vakulenko, Turbabina, Deviatkin, & Drexler, 2018). Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα οι Εντεροϊοί ήταν πηγή αρκετών πανδημιών όπως η πολιομυελίτιδα που προκαλείται από τους Πολιοϊούς (PV1,PV2,PV3), η αιμορραγική επιπεφυκίτιδα που προκαλείται από τον EV-D70, η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα που προκαλείται από τον EV-A71 και η ραγοειδίτιδα από τους Echo 11 και Echo 19 (Alexander N. Lukashev & Vakulenko, 2017).

Η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής των Εντεροϊών είναι η αλληλούχηση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες, αλλά και μικρές διαφορές μεταξύ αρκετών στελεχών ιών. Αναλυτικότερα, όσον αφορά την ταυτοποίηση των Εντεροϊών, κριτήριο διαφοροποίησης ανάμεσα στα στελέχη αποτελεί η διαφορά στην αλληλουχία της δομικής πρωτεΐνης VP1 του καψιδίου, η οποία μπορεί να διακρίνει αξιόπιστα γνωστούς τύπους μεταξύ τους (Oberste et al., 1999). Εντεροϊοί που διαφέρουν πάνω από 25% στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 από ήδη γνωστούς τύπους κατατάσσονται ως νέοι τύποι (Oberste et al., 1999).



Η τεχνολογία της αλληλούχησης έχει εφαρμοστεί επίσης σε μελέτες Πολιοϊών (PVs), όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη, για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των Πολιοϊών (Kew, Mulders, Lipskaya, da Silva, & Patlansch, 1995; Pliaka, Kyriakopoulou, & Markoulatos, 2012). Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί: (α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος Πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ των στελεχών σε μια επιδημία και (γ) διαφορές μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση τους (Lipskaya et al., 1995; Mulders et al., 1995).

Μελέτες που σχετίζονται με τη μοριακή επιδημιολογία των μη-πόλιο Εντεροϊών, έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που πηγάζει από τη σύγκριση διαφορετικών απομονώσεων του ιού μέσα σε έναν ορότυπο, καθώς και τη σύγκριση των απομονώσεων από διαφορετικούς οροτύπους και ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών εντός της οικογένειας *Picornaviridae* (Kyriakopoulou et al., 2018; Kyriakopoulou, Pliaka, Amoutzias, & Markoulatos, 2015; Nikolaidis et al., 2019). Οι μη-πόλιο Εντεροϊοί όπως για παράδειγμα οι Coxsackie A και B ιοί, αποτελούν το κορυφαίο αναγνωρίσιμο αίτιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας, η οποία είναι η πιο κοινή ασθένεια που σχετίζεται με λοιμώξεις από Εντεροϊούς. Σε εύκρατα κλίματα, αυτές οι λοιμώξεις εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των μηνών του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Τα μικρά παιδιά είναι τα πιο κοινά θύματα, επειδή ο αριθμός των μολύνσεων με Εντεροϊούς είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ηλικία των ευπαθών ατόμων. Τα νεογνά είναι σε κίνδυνο για σοβαρή συστηματική νόσο όπως ηπατική νέκρωση, μυοκαρδίτιδα, και νεκρωτική εντεροκολίτιδα, ενώ μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, είναι οι πλέον συνήθεις νόσοι.

## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μοριακή μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης των στελεχών των Εντεροϊών Sabin 1 και Echo 12 και η επίπτωση αυτής στο ιικό γονιδίωμα και κατά συνέπεια στην ικανότητα των ιών αυτών να μολύνουν κύτταρα και να ολοκληρώνουν επιτυχώς τον κύκλο ζωής τους.

Για το σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητος ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη ενός αριθμού τεχνικών και μεθόδων. Στο πρώτο στάδιο της διατριβής δημιουργήθηκαν κινητικές μελέτες για το κάθε στέλεχος στοχεύοντας τόσο το θετικό κλώνο με σκοπό την ανίχνευση της ύπαρξης του γονιδιώματος τους, όσο και τον αρνητικό κλώνο με σκοπό την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας τους.

Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας που απαιτείται για την αδρανοποίηση των δύο στελεχών σε μία πολύ υψηλή και μία αρκετά χαμηλή συγκέντρωση χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές παράλληλα με κυτταροκαλλιέργειες. Έπειτα, ακολούθησε διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στο γονιδίωμα στοχεύοντας τις πιο ευαίσθητες περιοχές (5'UTR, 3C, 3D και 3'UTR) για τυχόν ύπαρξη ρήξης.

Τέλος, έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης αξιόπιστων τεχνικών με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση για την ανίχνευση του γονιδιώματος των Εντεροϊών, όπως η Real Time RT-LAMP. Με την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου η οποία στοχεύει το θετικό κλώνο των Εντεροϊών, επιτυγχάνεται η εύκολη, γρήγορη και ειδική ανίχνευση τους σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή, μπορεί επίσης να αποτελέσει εναλλακτική προσέγγιση για την εξακρίβωση της επιτυχίας της θερμικής αδρανοποίησης των Εντεροϊών σε σύντομο χρονικό διάστημα συγκριτικά με άλλες μεθόδους.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε χρησιμοποιώντας 2 πρότυπα στελέχη Εντεροϊών, το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 που ανήκει στους Εντεροϊούς της ομάδας C και το πρότυπο στέλεχος Echo 12, που ανήκει στους Εντεροϊούς της ομάδας B.

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός καταχώρησης
PV-1	Sabin (LSc, 2ab)	V01150
E12	Travis (Philippines/53)	X79047

***Πίνακας 3.1.1:** Πίνακας πρότυπων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, στον οποίο αναφέρεται ο ορότυπος, το στέλεχος και ο αριθμός καταχώρησης του κάθε ιού.*

#### 3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Αρχικά, 100μl από κάθε πρότυπο στέλεχος ενοφθαλμίστηκαν σε ειδικές πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα Rd σε θρεπτικό μέσο D-MEM περιεκτικότητας 2% σε βόειο ορό (FBS). Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των αρνητικών μαρτύρων (κύτταρα Rd μη μολυσμένα σε θρεπτικό υλικό D-MEM με 2% ορό). Στη συνέχεια, ακολούθησαν αρκετές ανακαλλιιέργειες του κάθε ιού με σκοπό την αύξηση του ιικού τίτλου, έτσι ώστε να εμφανίζεται πλήρης καταστροφή των κυττάρων 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, οι φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της μέτρησης του ιικού τίτλου του κάθε ιού.

#### 3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΜΕΣΩ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΟΥ CCID<sub>50</sub>

Ο τίτλος του κάθε ιού που χρησιμοποιήθηκε υπολογίστηκε μέσω υπολογισμού της τιμής CCID<sub>50</sub>. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιιέργειας. Ο

τύπος του Karber (Hierholzer & Killington, 1996) μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι:

$$\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

Όπου:

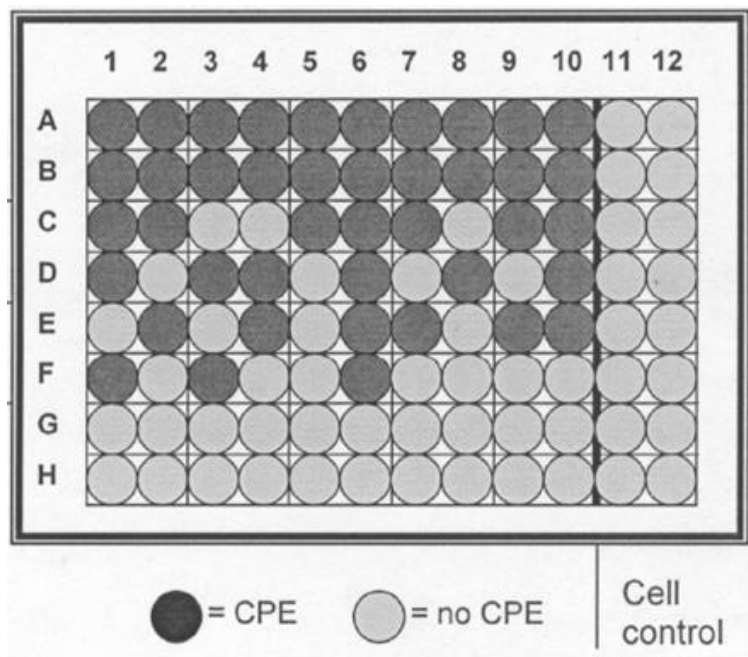
**CCID:** Cell Culture Infectious Dose

**L:** η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

**d:** η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

**S:** το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα: Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στην πλάκα, για κάθε ιικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε δημιουργήθηκαν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση  $10^{-8}$ . Έπειτα, 100μl από κάθε αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα και αυτή τοποθετήθηκε για επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Η παρακολούθηση της πλάκας για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκεσε μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Στη συνέχεια, έγινε η μέτρηση του  $\text{CCID}_{50}$  με τον τύπο που περιγράφηκε παραπάνω για τα στελέχη Sabin 1 και Echo 12.



**Εικόνα 3.3.1:** Η πλάκα μικροτιτλοποίησης για τον υπολογισμό του  $CCID_{50}$ . Οριζόντια τοποθετούνται οι σειριακές αραιώσεις με την αραιώση  $10^{-1}$  να αντιστοιχεί στη γραμμή Α και τη  $10^{-8}$  στη γραμμή Η. Οι στήλες 11 και 12 αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης.

### 3.4 ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ

Μετά τον υπολογισμό του ιικού τίτλου για τα δύο στελέχη, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις για την απόκτηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων  $10^6$  και  $10 CCID_{50}$  τόσο για το στέλεχος Sabin 1, όσο και για το στέλεχος Echo 12. Η υψηλή συγκέντρωση αποτελεί δικλείδα ασφαλείας για την αποτελεσματικότητα και τον έλεγχο της αδρανοποίησης, ενώ η χαμηλή συγκέντρωση είναι ενδεικτική της πραγματικής συγκέντρωσης των Εντεροϊών στο περιβάλλον.

### 3.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός της τιμής MOI (Multiplicity of Infection) που θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια. Η μέτρηση αφορούσε τον αριθμό των κυττάρων Rd που είχαν επιστρωθεί σε ειδικούς σωλήνες κυτταροκαλλιιεργειών, τους οποίους χρησιμοποιήσαμε

αργότερα για να γίνουν οι μολύνσεις. Αρχικά προστέθηκαν 2ml εναιωρήματος κυτταροκαλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό D-MEM με 2% ορό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 h με σκοπό την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας του κάτω μέρους των σωλήνων από τα κύτταρα Rd. Έπειτα, απορρίφθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 0.5ml διαλύματος θρυψίνης – EDTA εις διπλούν για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια των σωλήνων. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού D-MEM απουσία ορού με ταυτόχρονη ανάδευση για την διάσπαση τυχόν κυτταρικών συσσωμάτων. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν 0.2ml εναιωρήματος κυττάρων και 0.2ml διαλύματος Trypan Blue (0.1% w/v) σε σωλήνα eppendorf (2ml) και αναμείχθηκαν με πιπετάρισμα. Χρησιμοποιώντας πιπέτα Pasteur έγινε μεταφορά αρκετής ποσότητας του μίγματος στην εγκοπή του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο ανάστροφο μικροσκόπιο για την παρατήρηση και καταγραφή των ζωντανών κυττάρων. Το διάλυμα Trypan Blue χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα μπλε, οπότε μετρήθηκαν μόνο τα λευκά κύτταρα και μόνο όσα βρίσκονταν στις τέσσερις γωνίες του αιμοκυτταρόμετρου. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων ανά ml έγινε με βάση τον τύπο που αναγράφεται παρακάτω:

$$C = t \times tb \times \frac{1}{4} \times 10^4$$

Όπου:

**t**= ολικός αριθμός ζωντανών κυττάρων στις 4 γωνίες

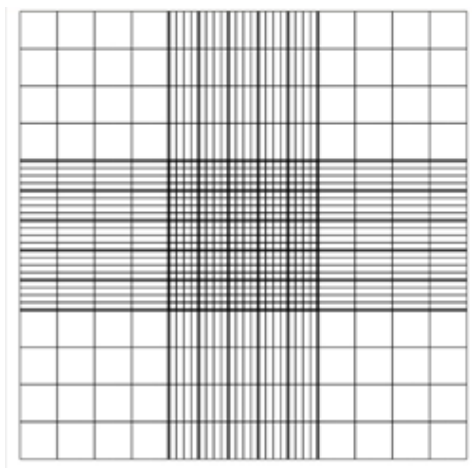
**tb** = αραίωση του Trypan blue (1/2)

$\frac{1}{4}$  = διόρθωση για να δοθεί ο μέσος όρος κυττάρων ανά γωνία

**10<sup>4</sup>**= συντελεστής ώστε να εκφραστούν τα κύτταρα ανά ml (1mm μήκος X 1 mm πλάτος X 0,1mm βάθος της κάθε γωνίας )

**C** = αριθμός κυττάρων ανά ml

**Π.χ. t = 480, tb=2 C = 480 x 2 x  $\frac{1}{4}$  x 10<sup>4</sup> = 2,4 x 10<sup>6</sup>**



**Εικόνα 3.5.1:** Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Οι τέσσερις γωνίες είναι οι θέσεις στις οποίες γίνεται η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων. Τα κύτταρα που βρίσκονταν σε όλες τις υπόλοιπες θέσεις, καθώς επίσης και πάνω στις γραμμές δεν μετρούνται.

### 3.6 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ ΜΟΙ

Η τιμή ΜΟΙ ή αλλιώς Multiplicity Of Infection, είναι η αναλογία μεταξύ του αριθμού των ιών σε μία μόλυνση και των κυττάρων-ξενιστών και υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\text{ΜΟΙ} = \frac{\text{CCID}_{50}}{\text{Αριθμός Κυττάρων}}$$

### 3.7 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΔΥΟ ΚΛΩΝΟΥΣ

#### 3.7.1 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΩΡΕΣ

Για να είναι δυνατή η κατασκευή κινητικών μελετών όσον αφορά το θετικό και τον αρνητικό κλώνο των δύο στελεχών των Εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε αρχικά μόλυνση κυττάρων Rd και απομόνωση των ιικών στελεχών συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, σωλήνες επιστρωμένοι με κύτταρα Rd σε θρεπτικό μέσο D-MEM χωρίς προσθήκη FBS μολύνθηκαν με τα πρότυπα στελέχη Sabin 1 και Echo 12 σε συγκεντρώσεις  $10^6$  και  $10 \text{ CCID}_{50}$ . Έπειτα, ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους  $37^\circ\text{C}$  σε συσκευή κυκλικής ανάδευσης και στη συνέχεια έγινε πλύση για την απομάκρυνση των ιών που δεν είχαν εισέλθει στα κύτταρα μέσα στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, έγιναν απομονώσεις 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 και 48h μετά τη μόλυνση των κυττάρων για κάθε μία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο στελεχών που

χρησιμοποιήθηκαν. Ταυτόχρονα με τις απομονώσεις πραγματοποιήθηκε και παρατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών για τυχόν ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Τέλος, ακολούθησε κατάψυξη των απομονώσεων στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για να διατηρηθούν μέχρι το επόμενο βήμα.

### 3.7.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η εκχύλιση του ιικού RNA, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το RNeasy mini kit της QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 700μl υλικό κυτταροκαλλιέργειας D-MEM χωρίς προσθήκη FBS και ακολούθησε ψύξη-απόψυξη για τρεις φορές έτσι ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 5 λεπτά στα 8.000g και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 350μl RLT buffer και έγινε vortex και ομογενοποίηση για 1min. Ακολούθως, έγινε προσθήκη 70% αιθανόλης και ο συνολικός όγκος των 700ml τοποθετήθηκε σε μία στήλη όπου και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 8.000g. Μετά την απομάκρυνση του υλικού που προέκυψε από την φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 700 μl buffer RWI και έγινε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 8.000g. Μετά την αφαίρεση του υλικού, προστέθηκαν 500 μl RPE buffer δύο φορές και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 8.000g. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο tube 1.5 ml όπου προστέθηκαν 50μl RNase free water και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min στα 8.000g με σκοπό να παραλάβουμε καθαρό το RNA που πέρασε από τη στήλη. Το RNA που απομονώθηκε φυλάχθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση.

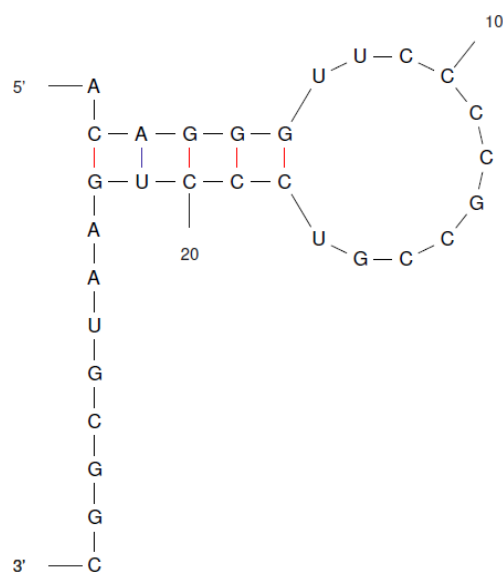
### 3.7.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Για τη δημιουργία της κινητικής μελέτης όσον αφορά την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, σχεδιάστηκαν εκκινητές τόσο για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (RT), όσο και για την αντίδραση της Real-time PCR.

Primer	Αλληλουχία	Θέση	Πολικότητα
EntNS4-RT	ACA GGG TTC CCC GCC GTC CCT GAA TGC GGC	451-469	Sense
EntNS2F	CGT TCC CCG CCG TCC CTG	-	Sense
UC53-Flap	AAT AAA TCA TAA TTG TCA CCA TAA CCA GCC A	588-606	Anti-sense

**Πίνακας 3.7.3.1:** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική του αρνητικού κλώνου, πληροφορίες για την αλληλουχία τους, τη θέση πρόσδεσής τους, και τη πολικότητά τους.





**Εικόνα 3.7.3.1:** Σχηματική απεικόνιση του εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε στην RT για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου. Στο 5'-άκρο υπάρχει μία δομή φουρκέτας, ενώ στο 3'-άκρο μία ειδική ική αλληλουχία.

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ένας ειδικός DNA-ολιγομερής εκκινητής με μία χαρακτηριστική δομή stem-loop (φουρκέτας) στο 5'-άκρο και μονόκλωνη μορφή στο 3' άκρο. Ως προς την αλληλουχία του, το 3' άκρο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό σε συντηρημένη περιοχή της 5'-UTR του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου των Εντεροϊών, ενώ το 5' άκρο του εκκινητή στην περιοχή της θηλιάς φέρει μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία δεν εντοπίζεται στο γονιδίωμα των Εντεροϊών και δημιουργεί μια θέση υβριδισμού του sense εκκινητή της Real-Time PCR που ακολουθεί. Ο σχεδιασμός του ειδικού stem-loop εκκινητή της RT έχει γίνει στοχεύοντας την 5'UTR των Εντεροϊών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών. Ο σχεδιασμός του συγκεκριμένου εκκινητή βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Anwar, August, & Too, 2006; Fikatas et al., 2017).

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της RT, ακολουθεί Real-Time PCR με το εκκινητικό ζεύγος EntNS2F/UC53-flap. Ο εκκινητής EntNS2F σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέεται απόλυτα πάνω σε ένα συγκεκριμένο σημείο του EntNS4-RT (πάνω στη δομή stem-loop), καθώς παρουσιάζουν την ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.7.3.1. Ο εκκινητής UC53-flap είχε σχεδιαστεί στοχεύοντας τμήμα της 5' UTR με σκοπό την ανίχνευση όλων των Εντεροϊών.

Για τη δημιουργία της κινητικής μελέτης όσον αφορά το θετικό κλώνο, η διαδικασία ήταν πιο απλή. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής για την ανίχνευση του θετικού κλώνου χρησιμοποιήθηκαν random primers (N7), αντί του ειδικού stem-loop εκκινητή που σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον αρνητικό κλώνο. Επίσης, για τη διαδικασία της Real-time PCR οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ζεύγος ENV2/ENV1, οι οποίοι είναι universal primers για την ανίχνευση των Εντεροϊών.

Primer	Αλληλουχία	Θέση	Πολικότητα
ENV2	CCC CTG AAT GCG GCT AAT C	451-469	Sense
ENV1	GAT TGT CAC CAT AAG CAG C	580-598	Anti-sense

**Πίνακας 3.7.3.2:** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κινητικής του θετικού κλώνου, πληροφορίες για την αλληλουχία τους, τη θέση πρόσδεσής τους, και τη πολικότητά τους.

#### 3.7.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Επειδή το γενετικό υλικό των Εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει Real-Time PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Για τον αρνητικό κλώνο αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 50pmol specific primer EntNS4-RT (MacroGen, South Korea), 2mM dNTPs και ddH<sub>2</sub>O έως 7μl. Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl ιικό RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf - Mastercycler για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του μονόκλωνου RNA. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται αμέσως στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1X First strand Buffer, 0,01M Dithiothreitol (DTT), 20U RNase out, 100U Superscript II (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) και ddH<sub>2</sub>O έως 8μl. Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε δύο διαφορετικές συνθήκες: 50 min στους 50°C για τον υβριδισμό του stem-loop εκκινητή και τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ανέρχεται στα 20μl.

Για το θετικό κλώνο αρχικά προετοιμάζεται το μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 100pmol random primers HEPTAN (N7) (MacroGen, South Korea), 2mM dNTPs και ddH<sub>2</sub>O έως 7μl. Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl ιικό RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf -Mastercycler για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του μονόκλωνου RNA. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται αμέσως στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 1X First strand Buffer, 0,01M Dithiothreitol (DTT), 20U RNase out, 100U M-MLV (Invitrogen) και ddH<sub>2</sub>O έως 8μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος

σε κάθε eppendorf και ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 min στους 25°C για τον υβριδισμό των τυχαίων εκκινητών, 50 min στους 37°C για τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ανέρχεται στα 20μl.

### 3.7.5 REAL-TIME PCR

Η Real-Time PCR επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αρχικού υπό μελέτη δείγματος. Η ποσοτικοποίηση αυτή είναι δυνατή χρησιμοποιώντας μια χρωστική, στην παρούσα διατριβή την SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA φθορίζοντας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (520nm). Η μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο οδηγεί στην κατασκευή ενός σχεδιαγράμματος (Amplification Plot), μέσω του οποίου υπολογίζεται το Ct (Cycle threshold), ο κύκλος δηλαδή στον οποίο υπερβαίνει την ουδό (threshold) η τιμή φθορισμού. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη αρχικών αντιγράφων σχετιζόμενα με την τιμή Ct, μέσω της οποίας υπολογίζεται η ποσότητα των αρχικών αντιγράφων του υπό μελέτη δείγματος. Για την μελέτη της εξειδίκευσης της μεθόδου χρησιμοποιείται το Melting Curve Analysis (ή Dissociation Curve) στο οποίο παρουσιάζεται ένα σχεδιάγραμμα μεταβολής φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία. Τμήματα ίσου μήκους με ίδια αλληλουχία εμφανίζουν μεταβολή στο φθορισμό στην ίδια θερμοκρασία, λόγω του Tm, ενώ η εμφάνιση μεταβολής φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες υποδηλώνει την ύπαρξη παραπροϊόντων.

Για την ανίχνευση του θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν και για τις δύο συγκεντρώσεις ( $10^6$  και  $10$  CCID<sub>50</sub>) για όλες τις απομονώσεις, εφαρμόστηκε Real-Time PCR χρησιμοποιώντας την τεχνολογία SYBR Green. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν ουσιαστικά μία κινητική για την αντιγραφική ενεργότητα των Εντεροϊών και μία κινητική για την ανίχνευση του γονιδιώματος των Εντεροϊών, ανάλογα με τις ώρες ανίχνευσης των δύο κλώνων. Η διαδικασία της Real-Time PCR ήταν η ίδια τόσο για τον αρνητικό, όσο και για το θετικό κλώνο με εξαίρεση τη χρήση των εκκινητών.

Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκε ένα μίγμα που περιείχε 2X SYBR Select qPCR Master Mix (Thermo Fischer SCIENTIF), 5pmol από τον κάθε εκκινητή και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 17μl. Το μίγμα αυτό προστέθηκε σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0.2ml

και προστέθηκαν 3μl από κάθε δείγμα. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005p (STRATAGENE, USA) στις συνθήκες:

1 <sup>ος</sup> κύκλος	-2 min στους 50° C για την ενεργοποίηση UDG -2 min στους 95° C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-15 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -1 min στους 60° C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1 <sup>ος</sup> κύκλος	- Ramping 55° C-95° C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

### 3.7.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ENY

#### 3.7.6.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ENY ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Οι κινητικές μελέτες που αναπτύχθηκαν εφαρμόστηκαν σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) τα οποία είχαν ελεγχθεί και ήταν θετικά για ύπαρξη Εντεροϊού. Τα συγκεκριμένα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν αρχικά σε κυτταροκαλλιέργεια με σκοπό την αύξηση του ιικού τίτλου τους, καθώς οι Εντεροϊοί βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από τις κινητικές μελέτες των πρότυπων στελεχών συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> και με βάση αυτά έγιναν οι απομονώσεις τις κατάλληλες ώρες για την ανίχνευση του θετικού και αρνητικού κλώνου στα ENY που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς όπως αναφέρθηκε η συγκέντρωση Εντεροϊών σε τέτοιου είδους δείγματα είναι μικρή. Αφού εντοπίστηκαν τα κλινικά δείγματα ENY στα οποία υπήρχε τόσο θετικός όσο και αρνητικός κλώνος, δηλαδή στα οποία οι Εντεροϊοί δεν υπήρχαν απλώς, αλλά ήταν και αντιγραφικά ενεργοί, ακολούθησε η διαδικασία ταυτοποίησής τους.

### 3.7.6.2 PCR, ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Στα κλινικά δείγματα ENY στα οποία οι Εντεροϊοί που ανιχνεύθηκαν ήταν και αντιγραφικά ενεργοί, ακολούθησε διαδικασία ταυτοποίησής τους. Έτσι, στο προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής για το θετικό κλώνο, που όπως περιγράφηκε παραπάνω παράχθηκε με τη χρήση random primers, πραγματοποιήθηκε PCR με το ειδικό ζεύγος εκκινητών AN89/AN88 με αλληλουχίες CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG/TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT αντίστοιχα, το οποίο στοχεύει στην καψιδιακή VP1 περιοχή. Η περιοχή αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση των Εντεροϊών μέσω της διαδικασίας της αλληλούχησης (Dimitriou et al., 2014; Kyriakopoulou et al., 2013).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 0,2 ml και σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl. Αρχικά προετοιμάστηκε το μίγμα το οποίο αποτελούνταν από 1 mM dNTPs, 1X KAPA Taq Buffer (στο οποίο περιέχονται ήδη 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,5 U ενζύμου KAPA Taq Polymerase, 25 pmol από κάθε εκκινητή και ddH<sub>2</sub>O έως 47 μl. Ακολούθως, προστέθηκαν σε κάθε μικροσωληνάριο erppendorf 3μl του αντίστοιχου δείγματος cDNA και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf - Mastercycler στις συνθήκες που αναφέρονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Ζεύγος εκκινητών για VP1		Συνθήκες αντίδρασης PCR
AN89 / AN88 (375bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 60° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία της PCR, ακολούθησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης σε συγκέντρωση που 2%, καθώς το προϊόν της PCR είναι στις 375bp. Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα αγαρόζης 1.2gr (Ultra-Pure Gel Agarose, Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr<sub>2</sub>) τέτοια ώστε

η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10µl προϊόντος ενίσχυσης αναμιγνύονται με 1X Gel Loading Buffer (κυανό της βρωμοφαινόλης, σουκρόζη 40%w/v και TBE) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων ενίσχυσης είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για περίπου 1 h.

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, ακολούθησε ο καθαρισμός τους από το πήκτωμα. Αφού οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα, τοποθετήθηκαν σε eppendorf των 1,5ml και ακολούθησε ο καθαρισμός με τη χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση του καθαρισμού μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων του καθαρισμού.

### **3.7.6.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR**

Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της PCR είναι τα εξής: α) η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, β) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και γ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με το ένζυμο EcoRI.

#### **α) Αντίδραση τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning):**

Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.1I- TOPO (Life Technologies, USA), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1µl φορέα pCR 2.1I-TOPO, 1µl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1µl ddH<sub>2</sub>O και 3µl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

#### β) Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων:

Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά 200μl δεκτικών κυττάρων *E. Coli* JM109 σε σωληνάρια errendorf των 2ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6μl του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων μέσω “heat shock”, όπου τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και ακολούθως τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2 λεπτά.

Οκτακόσια (800μl) θρεπτικού υποστρώματος LB Broth προστέθηκαν στα προϊόντα του “heat shock” και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό. Έπειτα, έγινε επίστρωση 150μl καλλιέργειας σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA).

Ακολούθησε ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Αφού αναπτύχθηκαν οι αποικίες, συλλέχθηκαν 2 λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε 2ml LB Broth με 100μg/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν ολονύχτια στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/λεπτό.

Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

#### γ) Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με το ένζυμο EcoRI

Σε μικροσωληνάρια των 500μl τοποθετήθηκαν τα παρακάτω: 2μl από το προϊόν απομόνωσης, 1X Buffer, 10U ένζυμο περιορισμού EcoRI και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 20μl. Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση στους 37°C για μία ώρα. Η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη 5μl 10X Loading Buffer και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%, όπως περιγράφεται παραπάνω.

#### **3.7.6.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR**

Οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς που απομονώθηκαν στο προηγούμενο βήμα, στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρεία MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχησης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές αλληλουχίες των υποκινητών T7 και SP6 που εντοπίζονται εκατέρωθεν του ενθέματος.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στελεχών Εντεροϊών, στη βάση δεδομένων του NCBI, με τη βοήθεια του BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **3.8 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ**

#### **3.8.1 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

Το πρότυπα ιικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή. Για την αδρανοποίηση χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις για το κάθε στέλεχος, μία αρκετά υψηλή της τάξης των  $[10^6]$  CCID<sub>50</sub> και μία αρκετά χαμηλή της τάξης των  $[10]$  CCID<sub>50</sub>. Οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 78°C, 80°C και 82°C για τη συγκέντρωση  $[10^6]$  CCID<sub>50</sub> και 45°C, 50°C, 55°C, 58°C, 60°C, 65°C και 70°C για τη συγκέντρωση  $[10]$  CCID<sub>50</sub>. Η αδρανοποίηση πραγματοποιήθηκε με επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή και ανά 10 λεπτά γινόταν ανάδευση μέσω vortex, ώστε να μη σχηματίζονται συσσωματώματα ιικών σωματιδίων.

#### **3.8.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

Μετά τη θερμική αδρανοποίηση ακολούθησε μόλυνση σωλήνων επιστρωμένων με κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (Rd) εις διπλούν για την κάθε θερμοκρασία και παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE), μέχρι την καταστροφή του αρνητικού μάρτυρα (μη μολυσμένα κύτταρα Rd). Στη συνέχεια έγιναν 3 ανακαλλιέργειες για κάθε θερμοκρασία που δεν εμφάνισε CPE στο πρώτο πέρασμα, ώστε να επαληθευτεί η επιτυχία της αδρανοποίησης. Αυτό είναι απαραίτητο, καθώς κατά τη θέρμανση μειώνεται αρκετά ο ιικός τίτλος και χωρίς ανακαλλιέργεια δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το αν αδρανοποιήθηκε ο ιός ή αν απλά έχει μειωθεί κατά πολύ ο ιικός του τίτλος και δεν είναι



ανιχνεύσιμος. Ακολούθησε συλλογή του περιεχομένου των σωλήνων και απομόνωση του γενετικού υλικού με σκοπό τον μοριακό έλεγχο της αποτελεσματικότητας αδρανοποίησης.

### **3.8.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΙΚΟΥ RNA**

Σε αυτό το κομμάτι της διατριβής η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου της Casas (I. Casas, Powell, Klapper, & Cleator, 1995). Συγκεκριμένα, μέσα σε erppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τους σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος με vortex και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και πραγματοποιήθηκε ξανά ανάδευση του μείγματος μέσω vortex και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14000g και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και ακόμη μία φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH<sub>2</sub>O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20°C για να ακολουθήσει η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.

### **3.8.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ**

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το γενετικό υλικό των Εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια ενίσχυση ενός τμήματος που μας ενδιαφέρει με τη χρήση μοριακών μεθόδων όπως για παράδειγμα PCR ή Real-Time PCR. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθήθηκε σε αυτό το στάδιο είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για το θετικό κλώνο, χρησιμοποιώντας τους random primers.

### **3.8.5 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΣΩ REAL-TIME PCR**

Ο μοριακός έλεγχος για την αποτελεσματικότητα της θερμικής αδρανοποίησης των ιικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μέσω Real-Time PCR στοχεύοντας το θετικό κλώνο σε κάθε θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε για αδρανοποίηση και για τις τρεις ανακαλλιέργειες. Κάθε δείγμα ελέγχθηκε εις διπλούν για επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη Real-Time PCR είναι η ίδια που περιγράφηκε προηγουμένως για το θετικό κλώνο χρησιμοποιώντας το universal ζεύγος εκκινητών ENV2/ENV1.

## **3.9 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ ΣΤΟ ΙΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**

### **3.9.1 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την αδρανοποίηση των ιικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, για το κάθε στέλεχος, χρησιμοποιήθηκαν και πάλι οι δύο συγκεντρώσεις  $[10^6]$  και  $[10]$  CCID<sub>50</sub>. Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν ήταν βάσει των αποτελεσμάτων που είχαν προκύψει από το προηγούμενο στάδιο της διατριβής και ήταν οι εξής: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C για τη συγκέντρωση  $[10^6]$  CCID<sub>50</sub> και 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C για τη συγκέντρωση  $[10]$  CCID<sub>50</sub>. Η αδρανοποίηση πραγματοποιήθηκε με επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή και ανά 10 λεπτά γινόταν ανάδευση μέσω vortex, ώστε να μη σχηματίζονται συσσωματώματα ιικών σωματιδίων.

Αμέσως μετά τη διαδικασία της θερμικής αδρανοποίησης ακολούθησε εκχύλιση του γενετικού υλικού, χωρίς τη μεσολάβηση κυτταροκαλλιέργειας, καθώς μας ενδιέφερε να εξετάσουμε την ύπαρξη πιθανόν ρήξεων στο γονιδίωμα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

### **3.9.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA**

Η εκχύλιση του ιικού RNA πραγματοποιήθηκε και σε αυτό το στάδιο της διατριβής ακολουθώντας το πρωτόκολλο της Casas (I. Casas et al., 1995) σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

### 3.9.3 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΕΥΡΕΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΡΗΞΗΣ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το κομμάτι της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιλέχθηκαν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία ή σχεδιάστηκαν ειδικά για την ενίσχυση των περιοχών (5'UTR, 3C, 3D και 3'UTR) που είναι οι πιο ευαίσθητες για τυχόν ύπαρξη ρήξης στους Εντεροϊούς, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Jin et al., 2012; Simonet & Gantzer, 2006).

Ο σχεδιασμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μέσω του προγράμματος Primer3 Plus (Rozen & Skaletsky, 2000) ακολουθώντας τα εξής βασικά κριτήρια:

- Μήκος εκκινητών: 20 έως 22 βάσεις
- Σημείο τήξης (Tm): 55°C έως 63°C
- Ποσοστό σε GC: 50% έως 60%

Από τα ζεύγη εκκινητών που προέκυψαν, επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκείνα τα οποία εμφάνιζαν τη μικρότερη συμπληρωματικότητα τόσο στα άκρα όσο και σε ολόκληρο το μήκος τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών μεταξύ των εκκινητών και δομών φουρκέτας, φαινόμενο που παρεμποδίζει τη διαδικασία της PCR.

Να σημειωθεί πως για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin1 χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές με την ονομασία SAB1 για την ενίσχυση της 3C και 3D περιοχής, ενώ για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές με την ονομασία ECHO12 για τη στόχευση των περιοχών 3C και 3D. Για την 5'UTR η οποία είναι η πλέον συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στους Εντεροϊούς, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UG52/UC53 και ENV2/ENV1 τόσο για το στέλεχος Sabin 1 όσο και για το στέλεχος Echo 12.

Η ονομασία, η αλληλουχία, η πολικότητα, η θερμοκρασία τήξης (Tm), η γενωμική περιοχή και η θέση στην οποία στοχεύουν οι εκκινητές παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Όνομα	Αλληλουχία (5' → 3')	Πολικότητα	Tm	Γενωμική Περιοχή	Θέση	Προϊόν
UG52	CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG	Sense	61.8	5'UTR	168-188	423bp
UC53	TTG TCA CCA TAA CCA GCC A	Antisense	56,4	5'UTR	588-606	
ENV2	CCC CTG AAT GCG GCT AAT C	Sense	59	5'UTR	451-469	147bp
ENV1	GAT TGT CAC CAT AAG CAG C	Antisense	58	5'UTR	580-598	
SAB1-3CF1	CCC ACC ATT AGG ACA GCA AA	Sense	60,88	3C	5.448	587bp
SAB1-3CR1	CTG GAT TTC ACC TTG ACT CTG A	Antisense	59,33	3C	6.035	
SAB1-3CF2	CAC CTG GTG AAA GCA TTG TG	Sense	60,15	3C	5.562	264bp
SAB1-3CR2	CGC CCA CCG AGA TTT AGA TA	Antisense	60,05	3C	5.826	
SAB1-3DF2	CAA CCT CCC ACT GGT GAC TT	Sense	60	3D	6.452	697bp
SAB1-3DR2	TCT CGT CTG CCC TGA AGA AT	Antisense	59,95	3D	7.149	
SAB1-3DF3	CTG GCC AGC TCA TGT CAC TA	Sense	60,01	3D	6.231	205bp
SAB1-3DR3	AAG TCA CCA GTG GGA GGT TG	Antisense	60	3D	6.436	
ECHO12P3-CF1	GTG CCC ACT CTG AGA CAA GC	Sense	61,02	3C	5.356	557bp
ECHO12P3-CR1	CCT AAG AAG AGC AGC GGA GA	Antisense	59,85	3C	5.913	
ECHO12P3-CF2	GCC TGG ACC GAC TAT TTT GA	Sense	60,07	3C	5.511	280bp
ECHO12P3-CR2	GCA TCC TCT TTG TGG GTG TT	Antisense	59,97	3C	5.791	
ECHO12P3-DF2	AAG GCA ATA AAG AGC CAG CA	Sense	59,98	3D	6.038	582bp
ECHO12P3-DR2	AGG TGG CCG TCT AAC ATC AC	Antisense	60	3D	6.620	
ECHO12P3-DR3	TGA AGC TGG GAA GGG TTA TG	Sense	60,07	3D	6.969	233bp
ECHO12P3-DF3	CAA GCC AAT AAG CAC AAC GA	Antisense	59,87	3D	7.202	
Anchor dT	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV	Antisense	72	Poly (A)	7.461	
Anchor Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	Antisense	66	Poly (A)	7.503	

**Πίνακας 3.9.3.1:** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση πιθανής ρήξης στο γονιδίωμα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

### 3.9.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ

Στη συγκεκριμένη ενότητα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για τη διεξαγωγή της αντίστροφης μεταγραφής. Πιο αναλυτικά, για κάθε ιικό στέλεχος και για τις δύο συγκεντρώσεις στις θερμοκρασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, διεξήχθησαν 4 διαφορετικές αντιδράσεις RT με τη χρήση διαφορετικού εκκινητή στοχεύοντας σε διαφορετική περιοχή κάθε φορά. Οι περιοχές αυτές ήταν η 5' UTR, η 3C, η

3D και η 3'UTR, οι οποίες γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι είναι εκείνες που θα μπορούσε ευκολότερα να δημιουργηθεί ρήξη όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Jin et al., 2012; Simonet & Gantzer, 2006). Έτσι, όσον αφορά το στέλεχος Sabin 1 εκτελέστηκαν οι εξής 4 αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής: μια αντίδραση RT με στόχο την 5'UTR με τη χρήση του antisense εκκινητή UC53, μια αντίδραση RT με στόχο την 3C περιοχή με την χρήση του ειδικού antisense εκκινητή SAB1-3CR1, μια αντίδραση RT με στόχο την 3D περιοχή με τη χρήση του ειδικού antisense εκκινητή SAB1-3DR2 και τέλος για την 3'UTR πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση RT με τη χρήση του εκκινητή Anchor dT. Ο εκκινητής αυτός διαθέτει μια σειρά από θυμίνες (T) με αποτέλεσμα να υβριδίζεται πάνω στην πολύ(Α) ουρά του στελέχους Sabin 1 και να ξεκινά από εκεί την σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA, ώστε να συμπεριλαμβάνει και την 3'UTR περιοχή.

Αντίστοιχα, για το στέλεχος Echo 12 πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω 4 αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής: μια αντίδραση RT με στόχο την 5'UTR με τη χρήση του ειδικού antisense εκκινητή UC53, μια αντίδραση RT με στόχο την 3C περιοχή με τη χρήση του ειδικού antisense εκκινητή ECHO12P3-CR1, μια αντίδραση RT με στόχο την 3D περιοχή με τη χρήση του ειδικού antisense εκκινητή ECHO12P3-DR2 και τέλος για την 3'UTR πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση RT με τη χρήση του εκκινητή Anchor dT. Ο εκκινητής αυτός διαθέτει μια σειρά από θυμίνες (T) με αποτέλεσμα να υβριδίζεται πάνω στην πολύ(Α) ουρά του στελέχους Echo 12 και να ξεκινά από εκεί την σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA, ώστε να συμπεριλαμβάνει και την 3'UTR περιοχή.

Για τις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 50pmol specific primer (Macrogen, South Korea) για την κάθε περιοχή, 2mM dNTPs (2mM) και ddH<sub>2</sub>O έως 7μl. Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl ιικό RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf - Mastercycler για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του μονόκλωνου RNA. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται αμέσως στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1X First strand Buffer, 0,01M Dithiothreitol (DTT), 20U RNase out, 100U Superscript II (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) και ddH<sub>2</sub>O έως 8μl. Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε δύο διαφορετικές συνθήκες:

Για την **5'UTR**: 50 min στους 42°C για τον υβριδισμό του UC53 εκκινητή και τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Για την **3C**: 50 min στους 50°C για τον υβριδισμό του SAB1-3CR1 ή ECHO12P3-CR1 ανάλογα με το στέλεχος και τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Για την **3D**: 50 min στους 50°C για τον υβριδισμό του SAB1-3DR2 ή ECHO12P3-DR2 ανάλογα με το στέλεχος και τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Για την **3'UTR**: 50 min στους 50°C για τον υβριδισμό του Anchor dT και τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου

### **3.9.5 PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΡΗΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**

Με την αντίδραση της PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση ενός τμήματος DNA που ορίζεται από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που επιλέγονται. Έτσι, ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά ενισχύονταν τμήμα από μια συγκεκριμένη περιοχή την οποία στόχευαν οι εκκινητές. Σκοπός ήταν αρχικά να εντοπιστεί η θερμοκρασία στην οποία δεν παίρνουμε πλέον προϊόν στην PCR, κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανής βλάβης στην εκάστοτε περιοχή, και επιπλέον η εύρεση της πιο ευαίσθητης περιοχής στη θερμική επεξεργασία πάνω στο γονιδίωμα των Εντεροϊών.

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε ένα από τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (Sabin 1 και Echo 12) εκτελέστηκαν 4 αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών κάθε φορά που επιτρέπουν την στόχευση τεσσάρων διαφορετικών περιοχών (5' UTR, 3C, 3D και 3' UTR) οι οποίες ενδέχεται να υφίστανται ρήξη κατά την διάρκεια της θερμικής αδρανοποίησης. Οι απλές αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν και στα δύο στελέχη για τη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub>. Για τη συγκέντρωση 10 CCID<sub>50</sub> χρησιμοποιήθηκε Nested-PCR, η οποία θα περιγραφεί στη συνέχεια, καθώς εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τη συμβατική PCR. Η PCR διεξαγόταν έχοντας ως μήτρα το εκάστοτε cDNA που είχε δημιουργηθεί για την κάθε περιοχή από τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 0,2 ml και σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl. Αρχικά προετοιμάστηκε το μίγμα το οποίο αποτελούνταν από 1 mM dNTPs, 1X KAPA Taq Buffer (στο οποίο περιέχονται ήδη 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,5 U ενζύμου KAPA Taq Polymerase, 25 pmol από κάθε εκκινητή και ddH<sub>2</sub>O έως 47 μl. Ακολούθως, προστέθηκαν σε κάθε μικροσωληνάριο erppendorf 3μl του

αντίστοιχου δείγματος cDNA και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf - Mastercycler στις συνθήκες που αναφέρονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Ζεύγος εκκινητών για 5'UTR		Συνθήκες αντίδρασης PCR
UG52 / UC53 423(bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 45° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Ζεύγη εκκινητών για 3C & 3D		Συνθήκες αντίδρασης PCR
-SAB1-3CF1 / SAB1-3CR1 (587bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
-SAB1-3DF2 / SAB1-3DR2 (697bp)	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
-ECHO12P3-CF1 / ECHO12P3-CR1 (557bp)	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων
-ECHO12P3-DF2 / ECHO12P3-DR2 (582bp)		

Για την 3'UTR η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν διαφορετική. Αρχικά, όπως περιγράφηκε παραπάνω συντέθηκε το cDNA με τη χρήση του Anchor dT ο οποίος υβριδοποιείται στην πολύ-A ουρά των στελεχών των Εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν και βρίσκεται στο 3' άκρο. Στη συνέχεια, για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10^6$  CCID<sub>50</sub> ακολούθησαν δύο PCR, η πρώτη στοχεύοντας την 3D περιοχή η οποία είναι η πιο κοντινή περιοχή στην 3' UTR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SAB1-3DF2/SAB1-3DR2 και η δεύτερη στοχεύοντας την 3C περιοχή που είναι αμέσως πριν την 3D χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SAB1-3CF1/SAB1-3CR1. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως αν η 3'UTR έχει υποστεί ρήξη δε θα πρέπει να πάρουμε προϊόν σε καμία από τις δύο PCR, γιατί δεν θα έχει συντεθεί το cDNA. Αντίθετα, για το στέλεχος E12 συγκέντρωσης  $10^6$  CCID<sub>50</sub> έγινε πρώτη PCR για 25 κύκλους χρησιμοποιώντας το εκκινητικό ζεύγος ECHO12P3-DF2/Anchor Primer και στη συνέχεια

Nested-PCR για 40 κύκλους χρησιμοποιώντας το εσωτερικό εκκινητικό ζεύγος ECHO12P3-DR3/ECHO12P3-DF3 στοχεύοντας την 3D. Έπειτα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για την 3C περιοχή χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ECHO12P3-CF1/ Anchor Primer στην πρώτη PCR και τους εσωτερικούς εκκινητές ECHO12P3-CF2/ ECHO12P3-CR2 στη Nested-PCR, πάλι με την ίδια λογική.

### 3.9.6 NESTED-PCR

Η Nested-PCR είναι μία διαδικασία που προσφέρει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με την απλή PCR. Η Nested-PCR είναι ένας συνδυασμός δυο διαδοχικών PCR αντιδράσεων κατά τις οποίες τα προϊόντα της πρώτης PCR χρησιμεύουν ως στόχοι της δεύτερης PCR αντίδρασης. Κατά την δεύτερη PCR χρησιμοποιείται ένα νέο εκκινητικό ζεύγος το οποίο τοποθετείται εσωτερικά του αρχικού εκκινητικού ζεύγους, προσφέροντας έτσι την αυξημένη ειδικότητα της μεθόδου. Βασικό μειονέκτημα της αποτελεί η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επιμολύνσεων. Για το λόγο αυτό, η πρώτη PCR εκτελείται στους 20 με 25 κύκλους, ενώ η δεύτερη PCR στους 30 με 40 κύκλους. Παραλλαγή της Nested-PCR αποτελεί η semi Nested-PCR στην οποία κατά τη δεύτερη PCR χρησιμοποιείται ένας ίδιος εκκινητής με την πρώτη PCR και ένας εσωτερικός.

Για τη συγκέντρωση 10 CCID<sub>50</sub> και για τα δύο στελέχη χρειάστηκε να γίνει είτε Nested-PCR είτε semi Nested-PCR σε όλες τις περιοχές. Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μίγμα το οποίο αποτελούταν από: 1mM dNTPs, 1X Kara Taq Buffer (στο οποίο περιέχονται ήδη 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 25pmol από τον κάθε εκκινητή, 1,5U Kara Taq Polymerase και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 48μl. Τέλος, σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 2μl από το προϊόν της πρώτης PCR. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η διαδικασία για την κάθε περιοχή ήταν οι εξής:

#### 5'UTR περιοχή

Ζεύγος εκκινητών για 5'UTR	Συνθήκες αντίδρασης 1 <sup>ης</sup> PCR	
UG52/UC53 (423bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
	25 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 45° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων



Ζεύγος εκκινητών για 5'UTR		Συνθήκες αντίδρασης Nested-PCR
ENV2/ENV1 (147bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

### 3C περιοχή

Ζεύγη εκκινητών για 3C		Συνθήκες αντίδρασης 1ης PCR
-SAB1-3CF1 / SAB1-3CR1 (587bp) -ECHO12P3-CF1 / ECHO12P3-CR1 (557bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
	25 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Ζεύγη εκκινητών για 3C		Συνθήκες αντίδρασης Nested-PCR
-SAB1-3CF2 / SAB1-3CR2 (264bp) -ECHO12P3-CF2 / ECHO12P3-CR2 (280bp)	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

### 3D περιοχή

Ζεύγη εκκινητών για 3D	Συνθήκες αντίδρασης 1 <sup>ης</sup> PCR	
	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
-SAB1-3DF3 / SAB1-3DR2 (918bp)	25 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -1 min στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
-ECHO12P3-DF2 / ECHO12P3-DF3 (1164bp)	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Ζεύγη εκκινητών για 3D	Συνθήκες αντίδρασης semi Nested-PCR	
	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
-SAB1-3DF3 / SAB1-3DR3 (205bp)	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
-ECHO12P3-DF2 / ECHO12P3-DR2 (582bp)	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

### 3' UTR περιοχή

Ζεύγη εκκινητών για 3'UTR στοχεύοντας την 3D περιοχή	Συνθήκες αντίδρασης 1 <sup>ης</sup> PCR	
	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
-SAB1-3DF3 / Anchor (1272bp)	25 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
-ECHO12P3-DF2 / Anchor (1465bp)	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

<b>Ζεύγη εκκινητών για 3'UTR στοχεύοντας την 3D περιοχή</b>	<b>Συνθήκες αντίδρασης semi Nested- PCR</b>	
	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
<b>-SAB1-3DF2 / Anchor (1051bp)</b>	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -1 min/30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
<b>-ECHO12P3-DR3 / Anchor (515bp)</b>	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

<b>Ζεύγη εκκινητών για 3'UTR στοχεύοντας την 3C περιοχή</b>	<b>Συνθήκες αντίδρασης 1ης PCR</b>	
	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
<b>-SAB1-3CF1 / Anchor (2055bp)</b>	25 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
<b>-ECHO12P3-CF1/ Anchor (2147bp)</b>	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

<b>Ζεύγη εκκινητών για 3'UTR στοχεύοντας την 3C περιοχή</b>	<b>Συνθήκες αντίδρασης Nested-PCR/ semi Nested-PCR</b>	
	1 κύκλος	3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA
<b>-SAB1-3CF2 / SAB1-3CR2 (264bp)</b>	40 κύκλοι	-30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec/ 2min στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση
<b>-ECHO12P3-CF2 / Anchor (1992bp)</b>	1 κύκλος	2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

### 3.9.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ

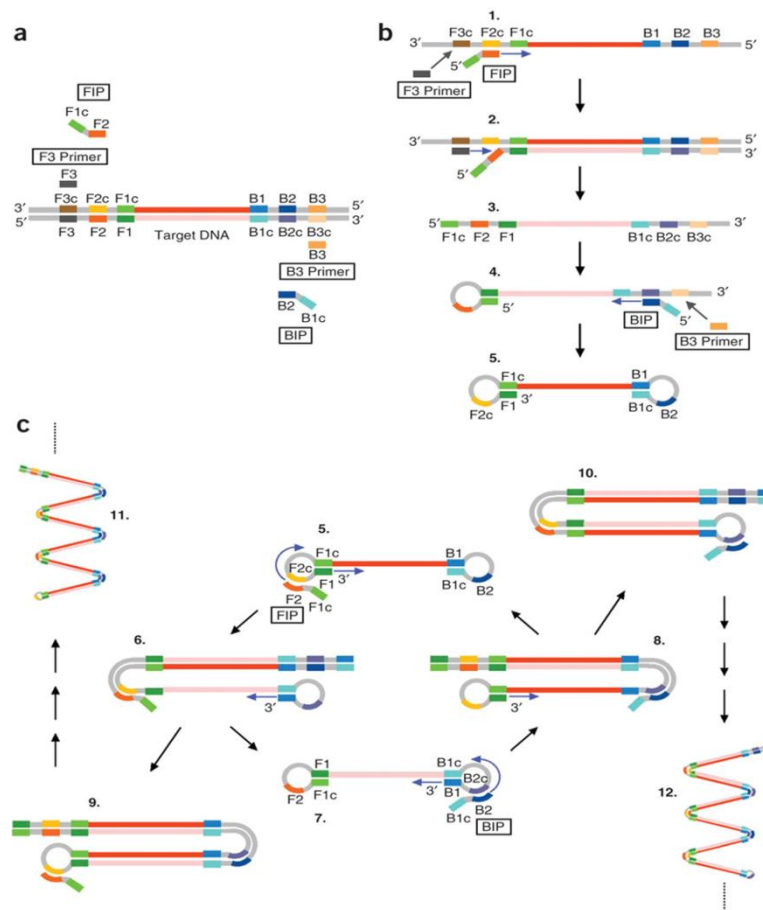
Για την ηλεκτροφόρηση των PCR, Nested-PCR και semi Nested-PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση που κυμαινόταν από 1,5 έως 2%, ανάλογα με το μήκος των αναμενόμενων προϊόντων της κάθε ηλεκτροφόρησης. Για προϊόντα μήκους μεγαλύτερου των 1000bp χρησιμοποιούνταν η συγκέντρωση 1.5% ενώ για προϊόντα μήκους μικρότερου των 1000bp η συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης (0.9gr ή 1.2gr) (Ultra-Pure Gel Agarose, Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr<sub>2</sub>) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10µl προϊόντος ενίσχυσης αναμιγνύονται με 1X Gel Loading Buffer (κυανό της βρωμοφαινόλης, σουκρόζη 40%w/v και TBE) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων ενίσχυσης είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) για τα προϊόντα μήκος μέχρι 1000bp και ο 1000bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) για τα προϊόντα μήκους μεγαλύτερου των 1000bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για περίπου 1 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε χρησιμοποιώντας ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

### 3.10 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ REAL TIME RT-LAMP ΜΕΘΟΔΟΥ

Με την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου η οποία στοχεύει τη συντηρημένη περιοχή 5'UTR του θετικού κλώνου των Εντεροϊών, επιτυγχάνεται η εύκολη, γρήγορη και ειδική ανίχνευση τους σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή, μπορεί επίσης να αποτελέσει εναλλακτική προσέγγιση για την εξακρίβωση της επιτυχίας της θερμικής αδρανοποίησης των Εντεροϊών σε μικρότερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με άλλες μεθόδους.

Η LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) είναι μία απλή, γρήγορη, ειδική και χαμηλού κόστους ισοθερμική τεχνική ενίσχυσης νουκλεοτιδικού στόχου η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση ιών (T. Notomi et al., 2000; Tsugunori Notomi, Mori, Tomita, & Kanda, 2015; Wong, Othman, Lau, Radu, & Chee, 2018). Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση τεσσάρων ή έξι διαφορετικών εκκινητών που στοχεύουν σε έξι ή οκτώ διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου, οι οποίοι είναι οι δύο εξωτερικοί (F3/B3), οι δύο εσωτερικοί (FIP/BIP) και οι loop primers (LoopF/LoopB), οι οποίοι μπορούν να μειώσουν στο 1/3 το χρόνο της αντίδρασης (Nagamine, Hase, & Notomi, 2002). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας μία ειδική πολυμεράση, την Bst20 ή την Bst3.0 η οποία διαθέτει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται  $10^8 - 10^9$  φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.10.1 που ακολουθεί, μέσω της LAMP δημιουργείται αρχικά η βασική δομή θηλιάς, η οποία προκύπτει από τη συμβολή και των τεσσάρων εκκινητών (FIP/BIP και F3/B3). Στη συνέχεια, η βασική θηλιά ενισχύεται και από αυτό το στάδιο και έπειτα στην αντίδραση συμμετέχουν μόνο οι δύο εσωτερικοί εκκινητές FIP/BIP και loop primers όταν χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Αποτέλεσμα της ενίσχυσης είναι η δημιουργία πολλών και διαφορετικών προϊόντων τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς τη δομή τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν είτε μέσω ηλεκτροφόρησης, είτε μέσω χρωματικής αλλαγής, είτε μέσω ανίχνευσης φθορισμού (Daskou, Dimitriou, et al., 2021; Daskou, Tsakogiannis, et al., 2021; Daskou et al., 2019; Fischbach, Xander, Frohme, & Glökler, 2015; Shirato et al., 2018).



**Εικόνα 3.10.1:** Οι διαφορετικές δομές των προϊόντων της LAMP. α) Ο αρχικός υβριδισμός των εκκινητών στο στόχο. β) Η δημιουργία της βασικής δομής θηλιάς της LAMP. γ) Οι διαφορετικές δομές που προκύπτουν κατά την ενίσχυση της βασικής θηλιάς  
 Πηγή: The principle of LAMP method- <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

### 3.10.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ REAL TIME RT-LAMP

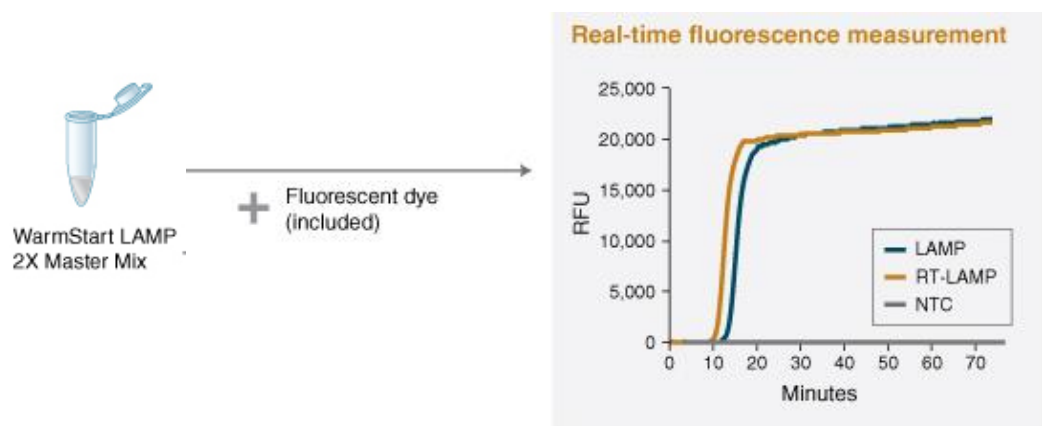
Για τη συγκεκριμένη μέθοδο σχεδιάστηκαν 3 ζεύγη εκκινητών πάνω στην 5' UTR του γονιδιώματος των Εντεροϊών με τη χρήση του προγράμματος Primer Explorer V5.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Θέση
F3	ACGGGACGCTAGTTGTGA	393-410
B3	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	580-599
FIP	ATTAGCCGCATTCAGGGGCC- ACAGGGTGTGAAGAGCCTAT	411-471
BIP	TGTCGTAACGCGCAAGTCCG- GAAACACGGACACCCAAAGT	512-565
LoopF	GGATTCTTATGTAGCCTC	429-44
LoopB	TGGCGGAACCGACT	529-542

**Πίνακας 3.10.1.1:** Αλληλουχία και θέση των εκκινητών της Real Time RT-LAMP.

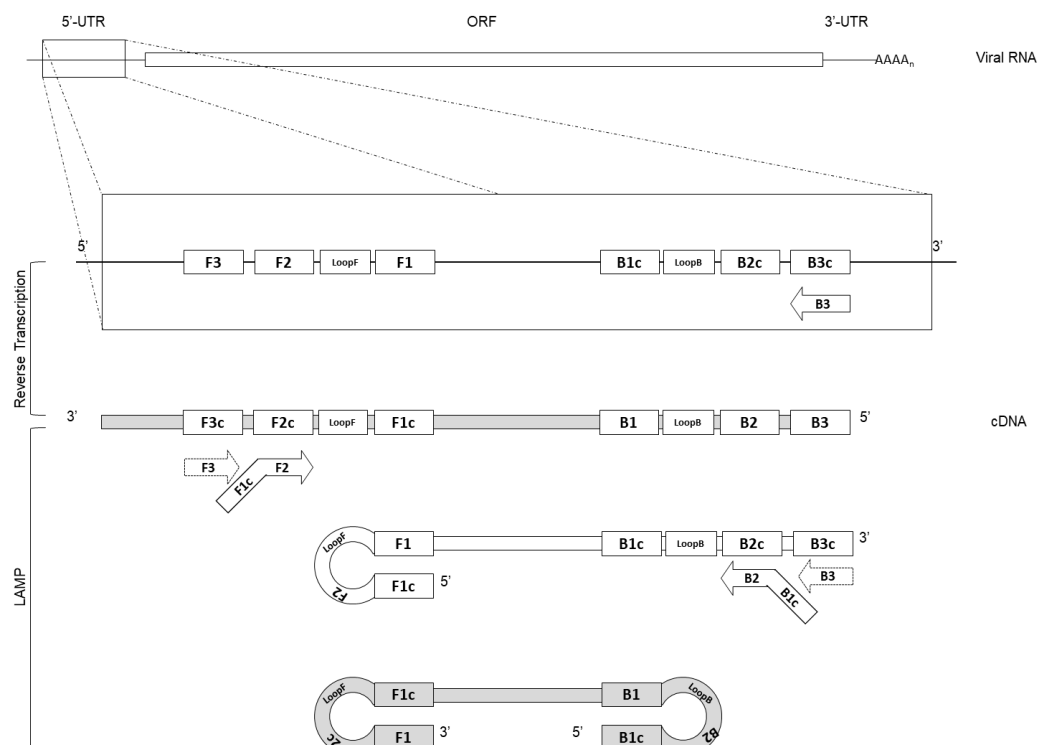
### 3.10.2 REAL TIME RT-LAMP

Η Real Time RT-LAMP επιτρέπει την ενίσχυση απευθείας από RNA ως μήτρα σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής. Για τη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA) της NEW ENGLAND BioLabs το οποίο έχει σχεδιαστεί για να παρέχει σε ένα βήμα κάτω από ισοθερμικές συνθήκες την ενίσχυση DNA ή RNA στόχου. Αυτό το kit αποτελείται από το WarmStart LAMP 2X Master Mix το οποίο περιέχει την ειδική DNA πολυμεράση με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου Bst 2.0 που χρησιμοποιείται στη LAMP και την αντίστροφη μεταγραφάση WarmStart RTx στο κατάλληλο buffer. Και τα δύο ένζυμα έχουν τροποποιηθεί ώστε να έχουν βελτιωμένη απόδοση στις αντιδράσεις LAMP και RT-LAMP. Στο kit περιέχεται επίσης και μία φθορίζουσα χρωστική ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της LAMP ή RT-LAMP.



**Εικόνα 3.10.2.1:** Σχηματική αναπαράσταση της WarmStart LAMP με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής (<https://international.neb.com>).

Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση ξεκινάει με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας τον εξωτερικό B3 ως εκκινητή για τη σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA, ο οποίος υβριδοποιείται στη συμπληρωματική B3c περιοχή. Στη συνέχεια, ξεκινάει ο πολλαπλασιασμός μέσω της LAMP με τη δράση της Bst 2.0 DNA pol και τη χρήση όλων των εκκινητικών μορίων. Η διαδικασία παρουσιάζεται στην εικόνα 3.10.2.2 που ακολουθεί.



**Εικόνα 3.10.2.2:** Σχηματική αναπαράσταση της Real Time RT-LAMP μεθόδου (Daskou, Dimitriou, et al., 2021)

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 12,5  $\mu$ l WarmStart LAMP 1X Master Mix, 2,5  $\mu$ l LAMP Primer Mix (1X) το οποίο περιείχε (1,6 $\mu$ M FIP/BIP, 0,2 $\mu$ M F3/B3, 0,4 $\mu$ M LoopF/LoopB), 1,25  $\mu$ l Fluorescent dye (1X), 3  $\mu$ l target RNA και 5,75  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25  $\mu$ l. Η αντίδραση πραγματοποιούνταν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005p (STRATAGENE, USA) στις συνθήκες:

- Incubation: 50 min στους 65° C
- Incubation: 5 min στους 80° C
- Dissociation: 55° C- 95° C

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε στην 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια σε κύτταρα Rd των στελεχών Sabin 1 και Echo 12 10<sup>6</sup> και 10 CCID<sub>50</sub>, που είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία. Χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική μέθοδος για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων θερμικής αδρανοποίησης στοχεύοντας τη συντηρημένη περιοχή 5'UTR, με σκοπό τη μείωση του χρόνου της αντίδρασης, καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εφαρμόζεται απευθείας σε RNA.



### 3.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΗΜΕΙΟΥ ΘΡΑΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ 5'UTR

Για τη μελέτη του σημείου θραύσης στην πλέον συντηρημένη περιοχή ανίχνευσης των Εντεροϊών 5'UTR, τα πρότυπα ιικά στελέχη S1 και E12 χρησιμοποιήθηκαν στην υψηλή συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub>. Αρχικά, τα στελέχη υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή σε θερμοκρασίες 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Η αδρανοποίηση πραγματοποιήθηκε με επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή και ανά 10 λεπτά γινόταν ανάδευση μέσω vortex, ώστε να μη σχηματίζονται συσσωματώματα ιικών σωματιδίων. Αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία, ακολούθησε εκχύλιση του ιικού RNA με τη μέθοδο Casas, χωρίς τη μεσολάβηση της κυτταροκαλλιέργειας.

Από αυτό το σημείο και έπειτα ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην πρώτη περίπτωση, η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Στη συνέχεια, 3μl από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής υποβλήθηκαν σε Real Time PCR με το universal εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 που στοχεύει σε τμήμα της 5'UTR και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των Εντεροϊών.

Στη δεύτερη περίπτωση, μετά την απευθείας εκχύλιση του γενετικού υλικού, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας τον ειδικό antisense εκκινητή UC53. Έπειτα, 3μl από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής υποβλήθηκαν σε PCR με το universal εκκινητικό ζεύγος UG52/UC53. Σε αυτή την περίπτωση επιλέχθηκε απλή PCR καθώς το προϊόν της αντίδρασης είναι μεγαλύτερο από 350 βάσεις που είναι ένα οριακό μέγεθος για να έχουμε καλά αποτελέσματα με Real Time PCR χρησιμοποιώντας την τεχνολογία SYBR Green.

Τα αποτελέσματα της Real Time PCR συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από την απλή PCR για τον προσδιορισμό της ρήξης στην 5'UTR. Να σημειωθεί πως ο antisense εκκινητής ENV1 βρίσκεται εσωτερικά του σημείου υβριδισμού του antisense εκκινητή UC53 πάνω στην αλληλουχία της περιοχής 5'UTR.

### **3.12 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GC ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ 5'UTR ΚΑΙ 3'UTR**

Μετά το πέρας των πειραματικών διαδικασιών, ελέγχθηκε η περιεκτικότητα σε GC των περιοχών 5'UTR και 3'UTR οι οποίες εντοπίστηκαν πειραματικά ως η πιο ανθεκτική και η πιο ευάλωτη αντίστοιχα. Έτσι, με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας τις κατατεθειμένες αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών των Εντεροϊών Sabin 1 και Echo 12, δημιουργήθηκε ένα γράφημα για την κάθε περιοχή μέσω του Excel, όπου παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε GC ανάλογα τη νουκλεοτιδική θέση. Επιπλέον, όσον αφορά την 5'UTR, πάνω στο γράφημα ορίζεται το τμήμα που ελέγχθηκε για ρήξη ανάλογα με τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

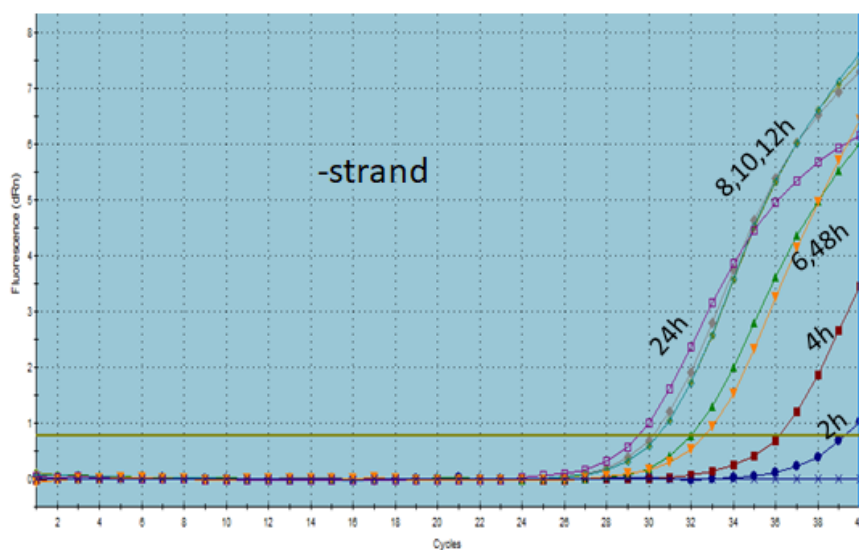
### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

#### 4.1.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ $10^6$ CCID<sub>50</sub>

Για το στέλεχος Sabin 1 με ιικό τίτλο  $10^6$  CCID<sub>50</sub> κατά τη διάρκεια των απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.1.1.1). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι CPE άρχισε να εμφανίζεται 10 ώρες μετά τη μόλυνση και ότι 48 ώρες μετά τη μόλυνση είχαμε σχεδόν πλήρη καταστροφή των κυττάρων. Το γεγονός αυτό, αιτιολογεί το αποτέλεσμα ότι η συγκέντρωση του αρνητικού κλώνου στη Real Time PCR (Εικόνα 4.1.1.1) μειώνεται αισθητά μέσα στα κύτταρα στις 48h, διότι έχει ξεκινήσει λύση των κυττάρων. Επίσης παρατηρούμε ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται από τις 4h και έπειτα (Εικόνα 4.1.1.1), κάτι που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 4 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Αντίθετα, η ανίχνευση του θετικού κλώνου ήταν δυνατή 2 ώρες μετά τη μόλυνση (Εικόνα 4.1.1.2). Παρατηρούμε επίσης ότι η συγκέντρωση του θετικού κλώνου είναι αρκετά μεγαλύτερη μέσα στα κύτταρα από ότι εκείνη του αρνητικού κλώνου, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Verheyden, Lauwers, & Rombaut, 2003). Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 12.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
Sabin 1 [ $10^6$ ]	απομον.							
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	απομον.						
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	-	απομον.					
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	-	-	απομον.				
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	-	-	-	απομον.			
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	-	-	-	1 <sup>+</sup>	απομον.		
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	-	-	-	1 <sup>+</sup>	1-2 <sup>+</sup>	απομον.	
Sabin 1 [ $10^6$ ]	-	-	-	-	1 <sup>+</sup>	1-2 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>	απομον.
(-)	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ

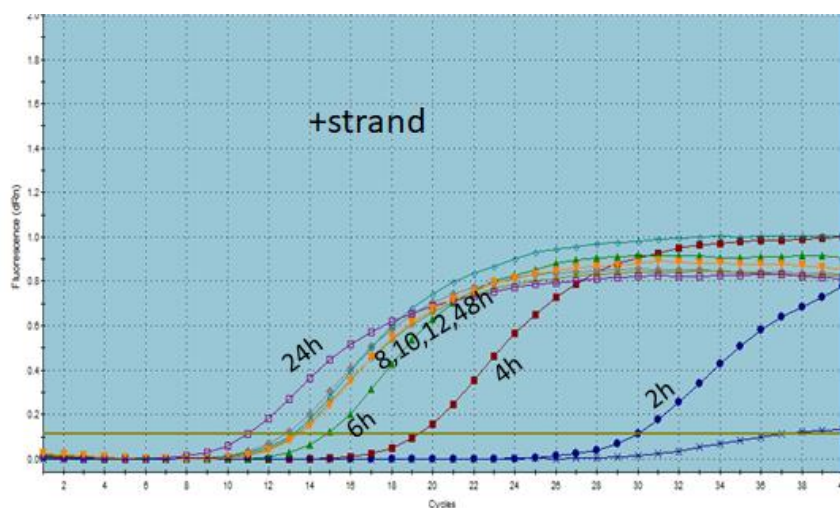
**Πίνακας 4.1.1.1:** Οι απομονώσεις του ιού στη μεγάλη συγκέντρωση και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



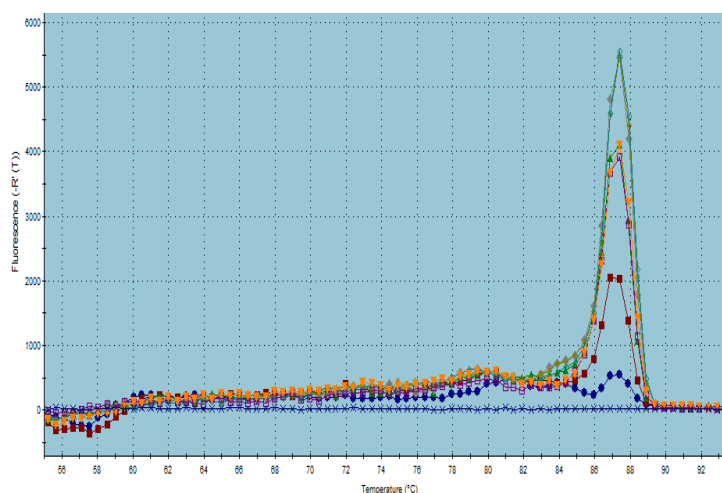
**Εικόνα 4.1.1.1:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου είναι δυνατή 4h μετά τη μόλυνση. Οι 8, 10 και 12h ανιχνεύονται σχεδόν ταυτόχρονα, γεγονός που υποδηλώνει πως η αντιγραφή πραγματοποιείται με τον ίδιο ρυθμό σε αυτές τις ώρες.

Χρώμα	cDNA
Μπλε	Sabin 1 [ $10^6$ ] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 6h
Γκρι	Sabin 1 [ $10^6$ ] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [ $10^6$ ] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 12h
Φούξια	Sabin 1 [ $10^6$ ] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O

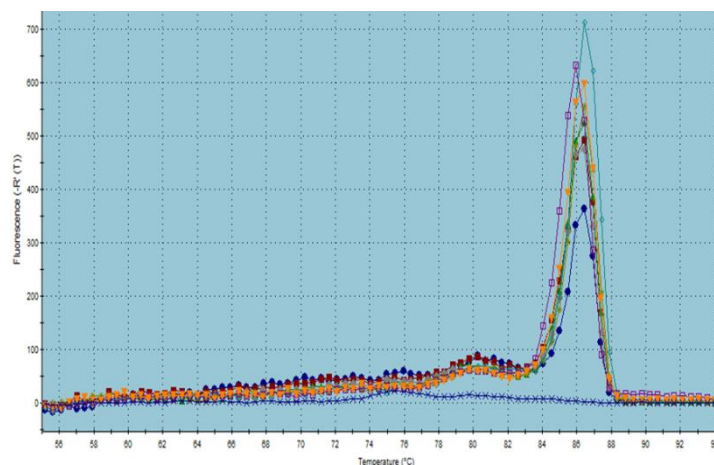
**Πίνακας 4.1.1.2:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις απομονώσεις του Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.1.1.2:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του θετικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι η ανίχνευση του θετικού κλώνου είναι δυνατή από τις 2h μετά τη μόλυνση.



**Εικόνα 4.1.1.3:** Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος,  $T_m$  87,4° C.



**Εικόνα 4.1.1.4:** Dissociation Curve του θετικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος,  $T_m$  86,4° C.

Χρώμα	cDNA
Μπλε	Sabin 1 [ $10^6$ ] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 6h
Γκρι	Sabin 1 [ $10^6$ ] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [ $10^6$ ] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 12h
Φούξια	Sabin 1 [ $10^6$ ] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [ $10^6$ ] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O

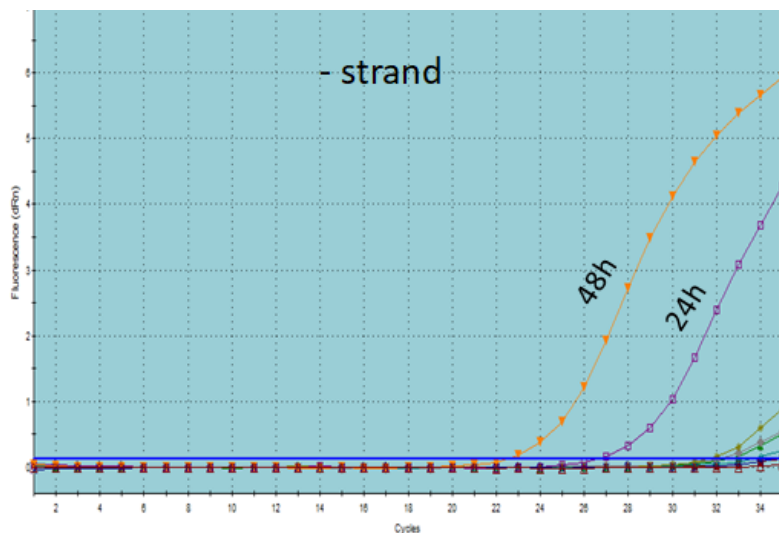
**Πίνακας 4.1.1.3:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Dissociation Curve με τις απομονώσεις του Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>.

#### 4.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID<sub>50</sub>

Για το στέλεχος Sabin 1 με ιικό τίτλο 10 CCID<sub>50</sub> κατά τη διάρκεια των απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.1.2.1). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι CPE εμφανίστηκε 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται μόνο στις 24 και 48h μετά τη μόλυνση των κυττάρων από τον Εντεροϊό (Εικόνα 4.1.2.1), κάτι που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει αρκετές ώρες μετά τη μόλυνση. Δηλαδή, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>, παρατηρείται μεγάλη αύξηση του χρόνου που χρειάζεται ο ιός για να μπορέσει τελικά να αντιγραφεί. Αντίθετα, ο θετικός κλώνος και για τη συγκεκριμένη συγκέντρωση ανιχνεύεται 2h μετά τη μόλυνση, όπως και για τη συγκέντρωση 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> με τη διαφορά ότι τα αρχικά αντίγραφα του θετικού κλώνου τώρα είναι λιγότερα μέσα στα κύτταρα από ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίστηκε 12x10<sup>-5</sup>.

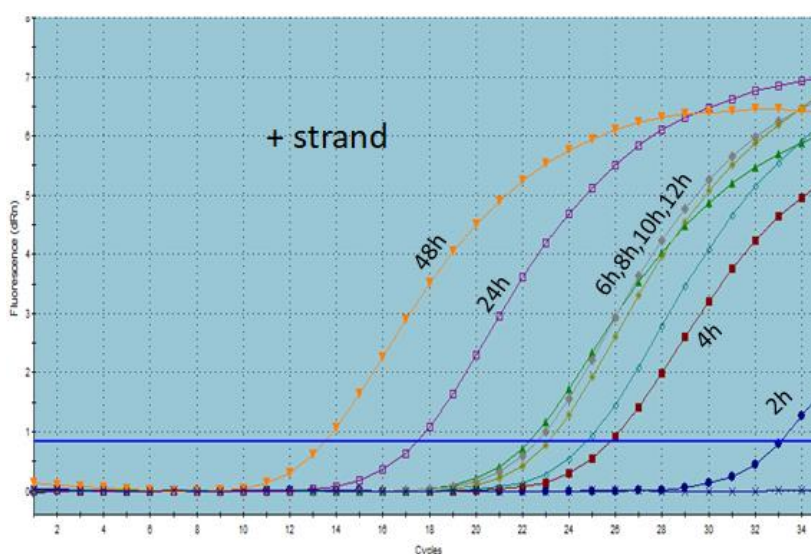
Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
Sabin 1 [10]	απομον.							
Sabin 1 [10]	-	απομον.						
Sabin 1 [10]	-	-	απομον.					
Sabin 1 [10]	-	-	-	απομον.				
Sabin 1 [10]	-	-	-	-	απομον.			
Sabin 1 [10]	-	-	-	-	-	απομον.		
Sabin 1 [10]	-	-	-	-	-	-	απομον.	
Sabin 1 [10]	-	-	-	-	-	-	-	2+
(-)	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ	Οκ	οκ	οκ

**Πίνακας 4.1.2.1:** Οι απομονώσεις του ιού με συγκέντρωση 10 CCID<sub>50</sub> και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



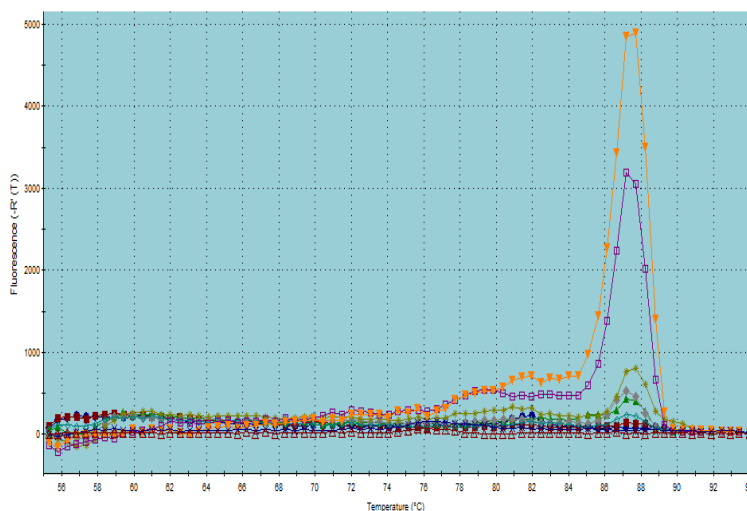
**Εικόνα 4.1.2.1:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι μόνο στις 24 και 48h εντοπίζεται ο αρνητικός κλώνος.

Χρώμα	cDNA
Μπλε	Sabin 1 [10] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [10] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [10] 6h
Γκρι	Sabin 1 [10] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [10] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [10] 12h
Φούξια	Sabin 1 [10] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [10] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O



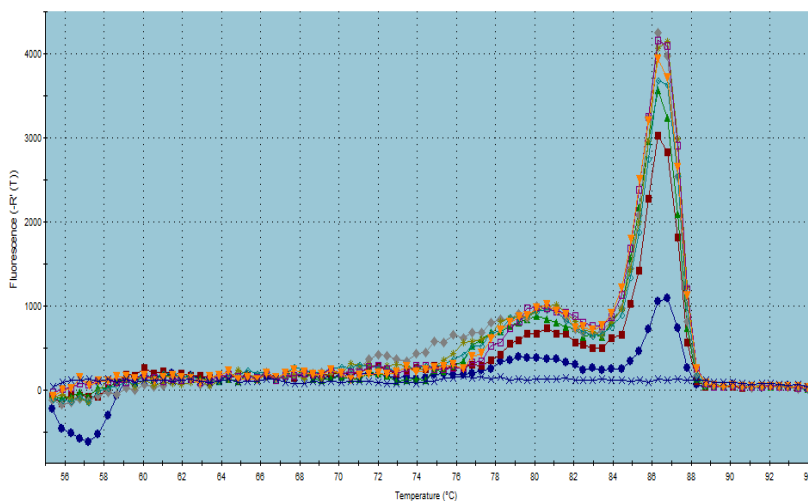
**Εικόνα 4.1.2.2:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του θετικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι εντοπίζεται από τις 2h και έπειτα.

**Πίνακας 4.1.2.2:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις απομονώσεις του Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.1.2.3:** Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T<sub>m</sub> 87,4° C.

Χρώμα	cDNA
Μπλε	Sabin 1 [10] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [10] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [10] 6h
Γκρι	Sabin 1 [10] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [10] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [10] 12h
Φούξια	Sabin 1 [10] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [10] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O



**Εικόνα 4.1.2.4:** Dissociation Curve του θετικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T<sub>m</sub> 86,4° C.

**Πίνακας 4.1.2.3:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Dissociation Curve με τις απομονώσεις του Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>.

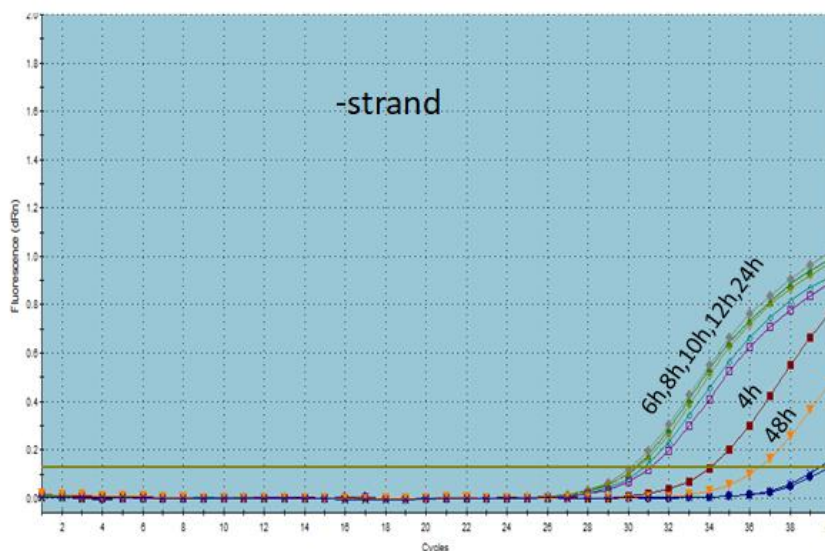


#### 4.1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΕCHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ $10^6$ CCID<sub>50</sub>

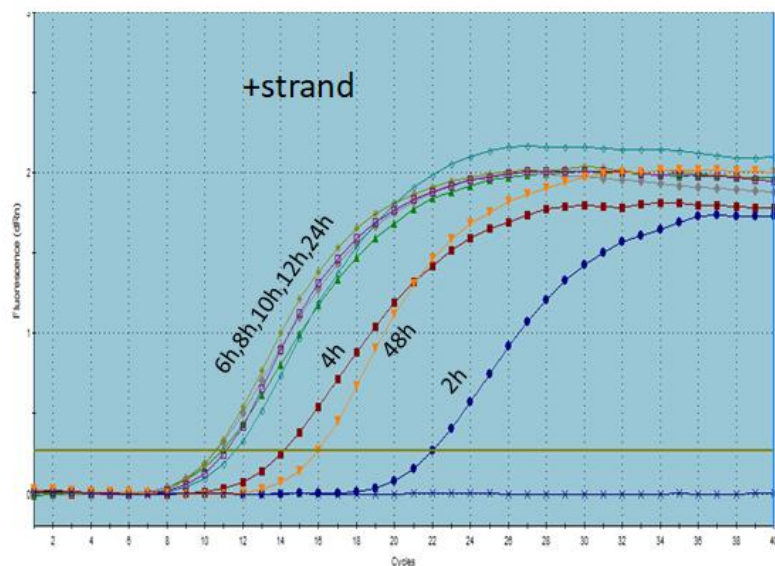
Για το στέλεχος E12 με ιικό τίτλο  $10^6$  CCID<sub>50</sub> κατά τη διάρκεια των απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.1.3.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι CPE άρχισε να εμφανίζεται 8 ώρες μετά τη μόλυνση και ότι 24 ώρες μετά τη μόλυνση είχαμε σχεδόν πλήρη καταστροφή των κυττάρων εξαιτίας του ιού. Το γεγονός αυτό, αιτιολογεί το αποτέλεσμα ότι η συγκέντρωση του αρνητικού κλώνου στη Real Time PCR (Εικόνα 4.1.3.1) μειώνεται αισθητά μέσα στα κύτταρα στις 24 και 48h, διότι έχει ξεκινήσει λύση των κυττάρων. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται από τις 4h και έπειτα (Εικόνα 4.1.3.1), που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 4 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Αντίθετα, ο θετικός κλώνος εντοπίζεται από τις 2h και έπειτα και πάλι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κύτταρα όπως συνέβη και με το Sabin 1. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 12.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
E 12 [ $10^6$ ]	απομον.							
E 12 [ $10^6$ ]	-	απομον.						
E 12 [ $10^6$ ]	-	-	απομον.					
E 12 [ $10^6$ ]	-	-	-	απομον.				
E 12 [ $10^6$ ]	-	-	-	1 <sup>+</sup>	απομον.			
E 12 [ $10^6$ ]	-	-	-	1 <sup>+</sup>	2 <sup>+</sup>	απομον.		
E 12 [ $10^6$ ]	-	-	-	1 <sup>+</sup>	2 <sup>+</sup>	2-3 <sup>+</sup>	απομον.	
E 12 [ $10^6$ ]	-	-	-	1 <sup>+</sup>	2 <sup>+</sup>	2-3 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>	απομον.
(-)	οκ	οκ	οκ	οκ	οκ	Οκ	οκ	οκ

**Πίνακας 4.1.3.1:** Οι απομονώσεις του ιού στη μεγάλη συγκέντρωση και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



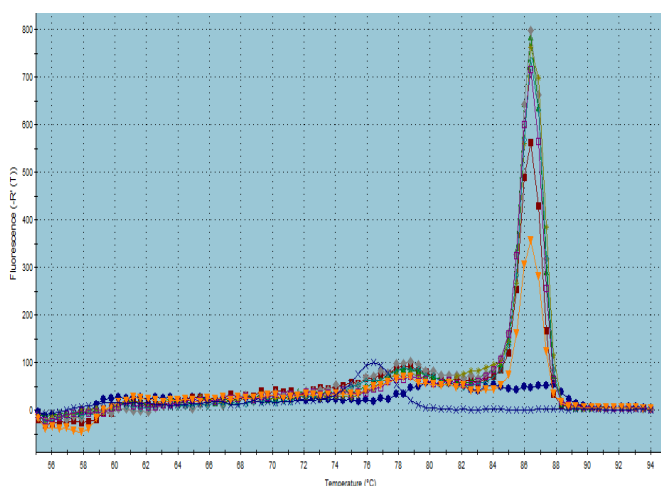
**Εικόνα 4.1.3.1:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι από τις 4h μετά τη μόλυνση ανιχνεύεται ο αντιγραφόμενος κλώνος.



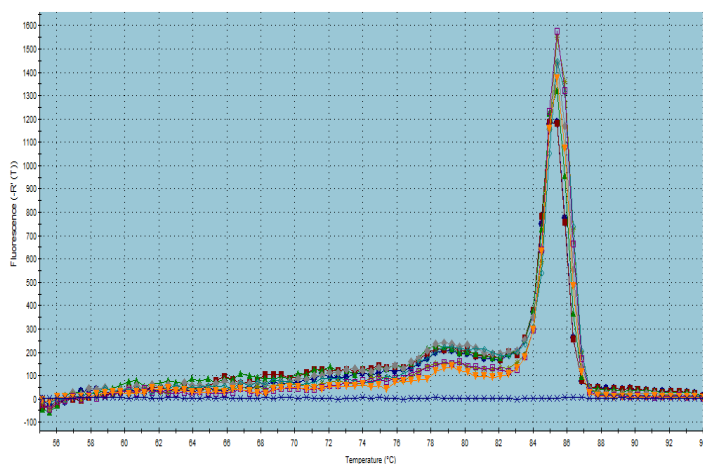
**Εικόνα 4.1.3.2:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του θετικού κλώνου του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι από τις 2h μετά τη μόλυνση ανιχνεύεται ο θετικός κλώνος.

Χρώμα	cDNA
Έντονο μπλε	E12 [ $10^6$ ] 2h
Κόκκινο	E12 [ $10^6$ ] 4h
Πράσινο	E12 [ $10^6$ ] 6h
Γκρι	E12 [ $10^6$ ] 8h
Χρυσό	E12 [ $10^6$ ] 10h
Γαλάζιο	E12 [ $10^6$ ] 12h
Φούξια	E12 [ $10^6$ ] 24h
Κίτρινο	E12 [ $10^6$ ] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O

**Πίνακας 4.1.3.2:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις απομονώσεις του E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.1.3.3:** *Dissociation Curve* του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος,  $T_m$  87,4° C. Η μικρότερη κορυφή απεικονίζει τα διμερή των εκκινητών.



**Εικόνα 4.1.3.4:** *Dissociation Curve* του θετικού κλώνου του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος,  $T_m$  86,4° C.

Χρώμα	cDNA
Έντονο μπλε	E12 [ $10^6$ ] 2h
Κόκκινο	E12 [ $10^6$ ] 4h
Πράσινο	E12 [ $10^6$ ] 6h
Γκρι	E12 [ $10^6$ ] 8h
Χρυσό	E12 [ $10^6$ ] 10h
Γαλάζιο	E12 [ $10^6$ ] 12h
Φούξια	E12 [ $10^6$ ] 24h
Κίτρινο	E12 [ $10^6$ ] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O

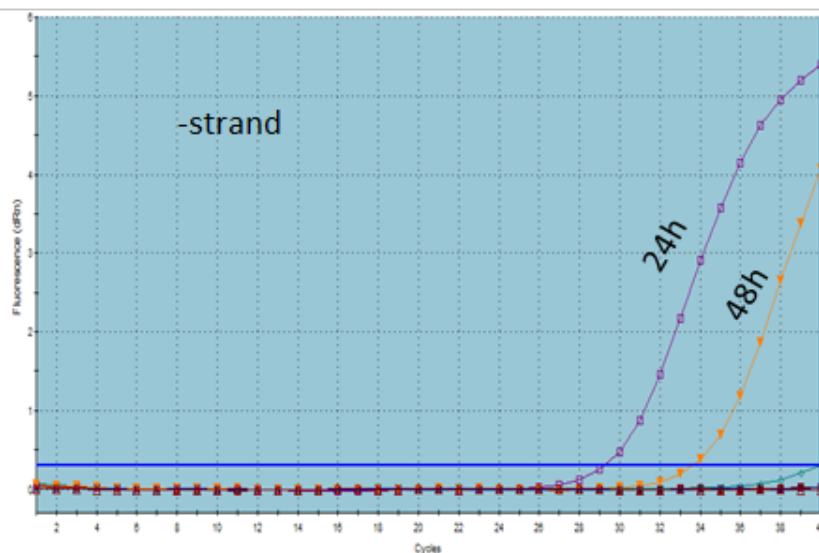
**Πίνακας 4.1.3.3:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο *Dissociation Curve* με τις απομονώσεις του E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>.

#### 4.1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΛΩΝΟ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID<sub>50</sub>

Για το στέλεχος Echo 12 με ιικό τίτλο 10 CCID<sub>50</sub> κατά τη διάρκεια των απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.1.4). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι εμφανίστηκε CPE 3<sup>+</sup> στις 48h ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται από τις 24h και στις 48h μετά τη μόλυνση των κυττάρων από τον Εντεροϊό (Εικόνα 4.1.4), που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Δηλαδή, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>, παρατηρείται μεγάλη αύξηση του χρόνου που χρειάζεται ο ιός για να μπορέσει τελικά να αντιγραφεί, όπως ακριβώς συμβαίνει και με το στέλεχος Sabin 1 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, ο θετικός κλώνος εντοπίστηκε 4 ώρες μετά τη μόλυνση, όμως τα αρχικά αντίγραφα του είναι λιγότερα μέσα στα κύτταρα από ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 10<sup>6</sup>. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 12x10<sup>-5</sup>.

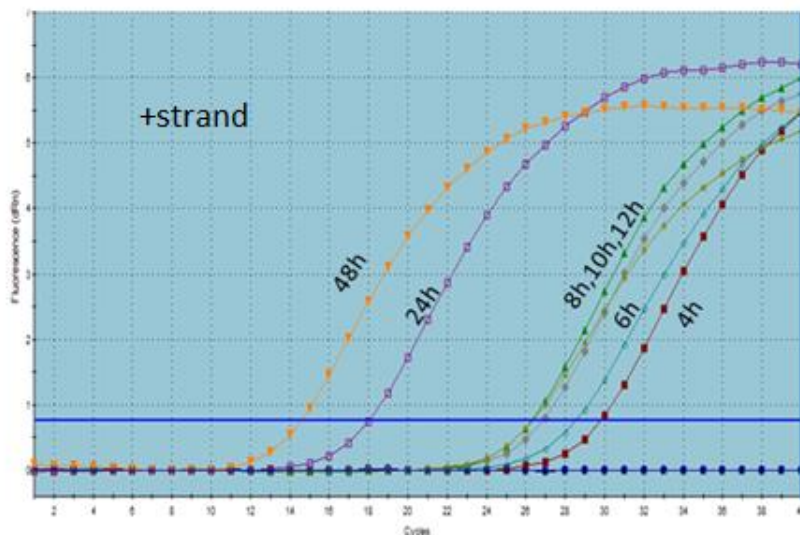
Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
E 12 [10]	απομον.							
E 12 [10]	-	απομον.						
E 12 [10]	-	-	απομον.					
E 12 [10]	-	-	-	απομον.				
E 12 [10]	-	-	-	-	απομον.			
E 12 [10]	-	-	-	-	-	απομον.		
E 12 [10]	-	-	-	-	-	-	απομον.	
E 12 [10]	-	-	-	-	-	-	-	3+
(-)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

**Πίνακας 4.1.4.1:** Οι απομονώσεις του ιού στη μικρή συγκέντρωση και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



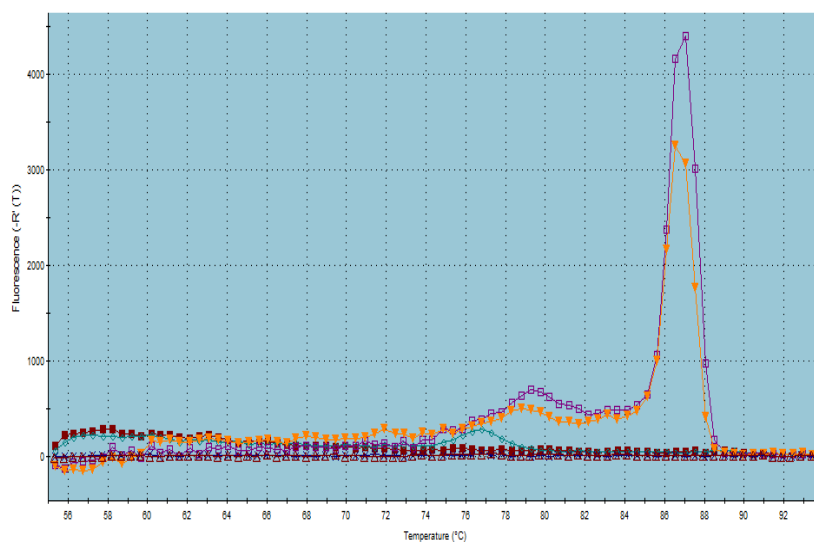
**Εικόνα 4.1.4.1:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [10] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι μόνο στις 24 και 48h μετά τη μόλυνση έχουμε ανίχνευση του αρνητικού κλώνου και επίσης ότι στις 48h έχουμε μείωση της συγκέντρωσής του μέσα στα κύτταρα καθώς είχε CPE 3+ τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Χρώμα	cDNA
Έντονο μπλε	E12 [10] 2h
Κόκκινο	E12 [10] 4h
Πράσινο	E12 [10] 6h
Γκρι	E12 [10] 8h
Χρυσό	E12 [10] 10h
Γαλάζιο	E12 [10] 12h
Φούξια	E12 [10] 24h
Κίτρινο	E12 [10] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O



**Εικόνα 4.1.4.2:** Κινητική μελέτη ανίχνευσης του θετικού κλώνου του στελέχους E12 [10] CCID<sub>50</sub>. Παρατηρούμε ότι από τις 4h μετά τη μόλυνση ανιχνεύεται ο θετικός κλώνος.

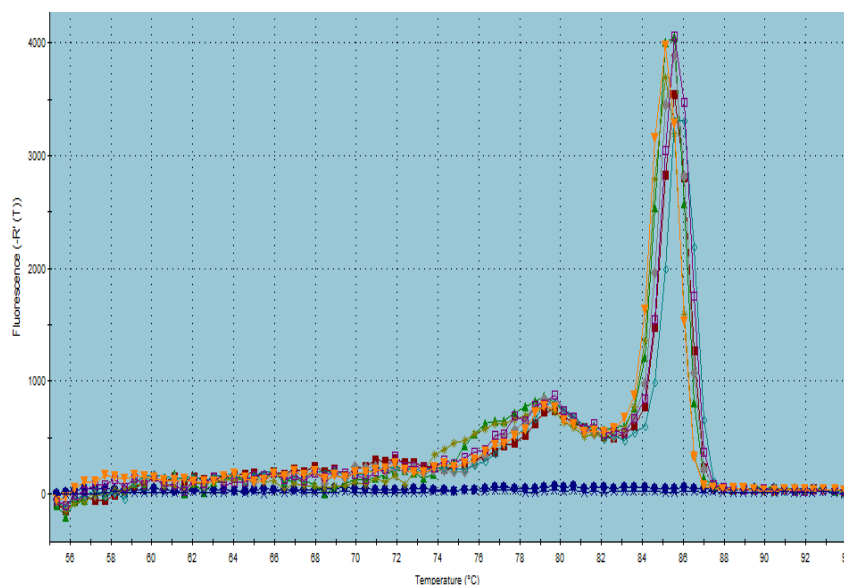
**Πίνακας 4.1.4.2:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις απομονώσεις του E12 [10] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.1.4.3:** *Dissociation Curve* του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [10] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T<sub>m</sub> 87,4° C

Χρώμα	cDNA
Έντονο μπλε	E12 [10] 2h
Κόκκινο	E12 [10] 4h
Πράσινο	E12 [10] 6h
Γκρι	E12 [10] 8h
Χρυσό	E12 [10] 10h
Γαλάζιο	E12 [10] 12h
Φούξια	E12 [10] 24h
Κίτρινο	E12 [10] 48h
Μπλε	ddH <sub>2</sub> O

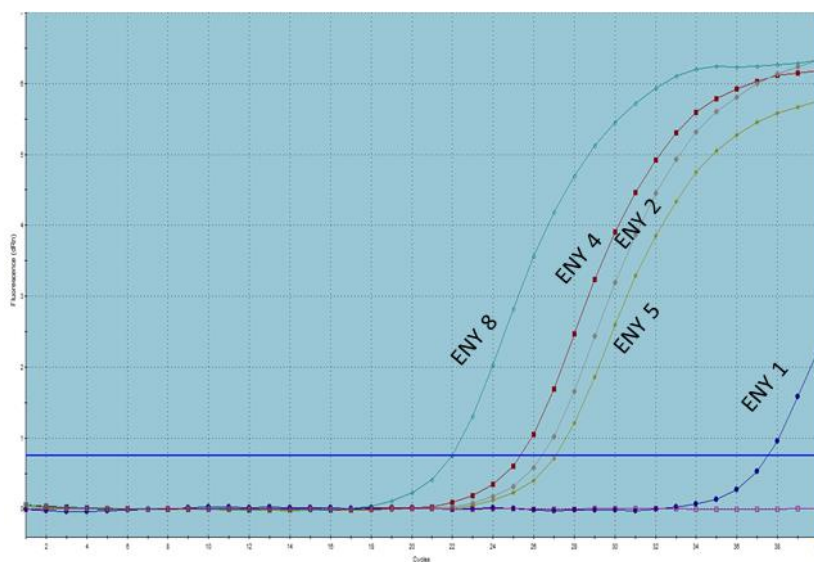
**Πίνακας 4.1.4.3:** Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο *Dissociation Curve* με τις απομονώσεις του E12 [10] CCID<sub>50</sub>.



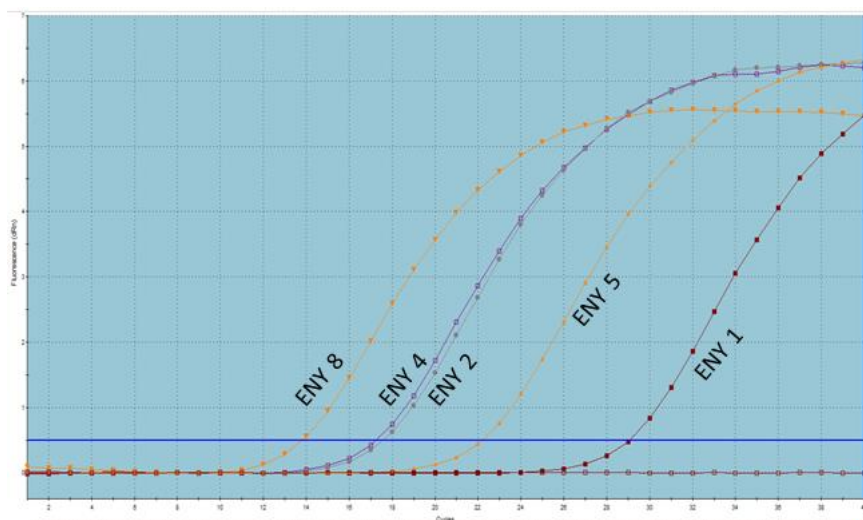
**Εικόνα 4.1.4.4:** *Dissociation Curve* του θετικού κλώνου του στελέχους E12 [10] CCID<sub>50</sub> που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T<sub>m</sub> 86,4° C.

#### 4.1.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ENY

Από τα συνολικά κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο πέντε ήταν αυτά στα οποία ανιχνεύθηκε και θετικός και αρνητικός κλώνος στις 24h μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, όπου και απομονώθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων των κινητικών μελετών ανίχνευσης των δύο κλώνων της χαμηλής συγκέντρωσης των πρότυπων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι στα παρακάτω διαγράμματα Amplification plot και Dissociation curve, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των πέντε κλινικών δειγμάτων μετά από 3 ανακαλλιέργειες σε κύτταρα Rd για τον αρνητικό και το θετικό κλώνο.

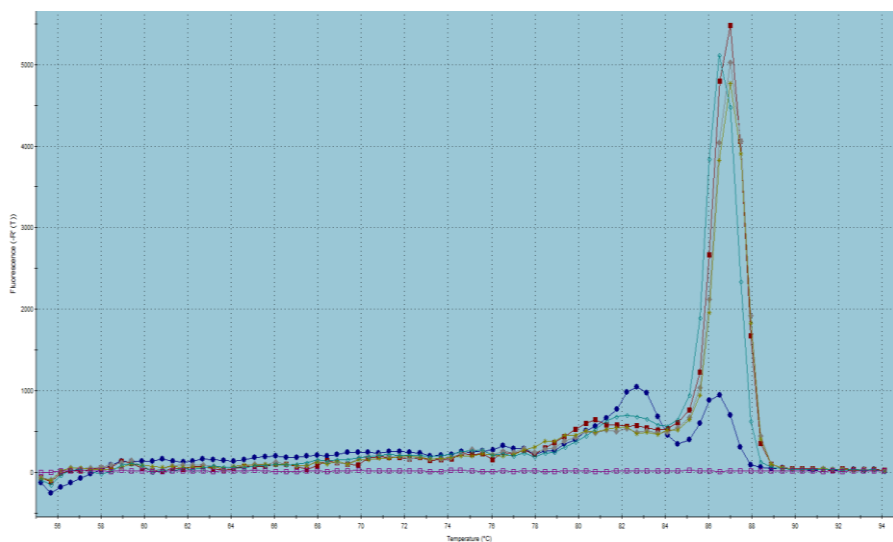


**Εικόνα 4.1.5.1:** Αποτελέσματα ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου 24h pi για τα 5 ENY.

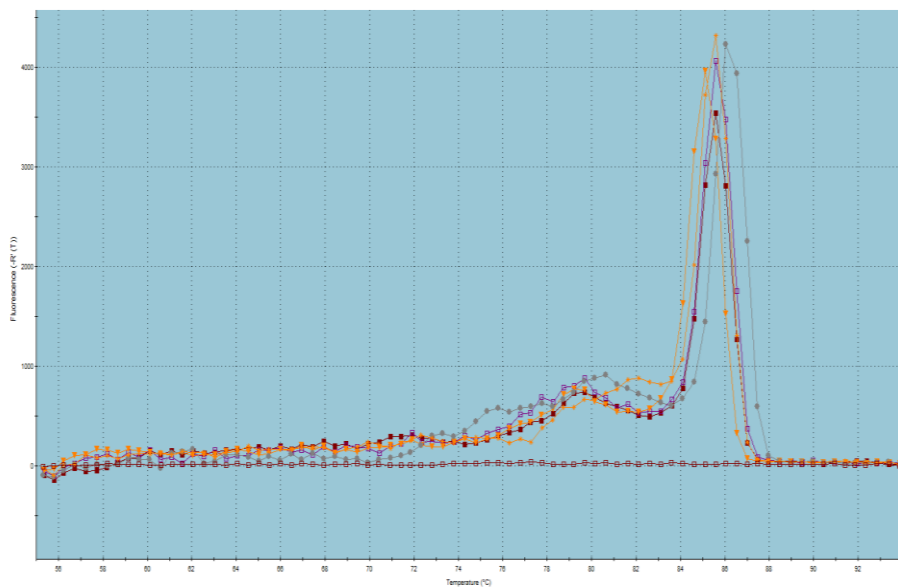


**Εικόνα 4.1.5.2:** Αποτελέσματα ανίχνευσης του θετικού κλώνου 24h pi για τα 5 ENY.





**Εικόνα 4.1.5.3:** *Dissociation Curve* του αρνητικού κλώνου των 5 ENY που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.



**Εικόνα 4.1.5.4:** *Dissociation Curve* του θετικού κλώνου των 5 ENY που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.



Όσον αφορά την παρατήρηση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια των 5 ENY σε κύτταρα Rd τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.5.1 που ακολουθεί. Τα δείγματα ελέγχθηκαν εις διπλούν. Ο πρώτος σωλήνας από κάθε δείγμα απομονώθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας (24h pi) ώστε να γίνει έλεγχος για το θετικό και αρνητικό κλώνο, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω και άρα η παρατήρηση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE έγινε μέχρι αυτή τη χρονική στιγμή. Ο δεύτερος σωλήνας από κάθε δείγμα απομονώθηκε 4 μέρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Δείγμα	1 <sup>η</sup> Μέρα	2 <sup>η</sup> Μέρα	3 <sup>η</sup> Μέρα	4 <sup>η</sup> Μέρα
ENY 1 (1)	-/1+			
ENY 1 (2)	-/1+	1+	1-2+	2+
ENY 2 (1)	-			
ENY 2 (2)	-	1-2+	3+	3-4+
ENY 4 (1)	2+			
ENY 4 (2)	2+	3-4+	Κατάψυξη	
ENY 5 (1)	-			
ENY 5 (2)	-	-	1+	2+
ENY 8 (1)	1+			
ENY 8(2)	1+	2-3+	3+	4+
RD (CC)	οκ	οκ	Οκ	οκ

**Πίνακας 4.1.5.1:** Παρουσίαση των αποτελεσμάτων CPE των πέντε κλινικών δειγμάτων ENY.

Από τα αποτελέσματα CPE βλέπουμε πως μέσω της κυτταροκαλλιέργειας μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα για την ενεργότητα ενός Εντεροϊού σε ένα κλινικό δείγμα ENY, σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα όμως συγκριτικά με τις μοριακές μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε για την ανίχνευση του θετικού και του αρνητικού κλώνου 24 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Στο αντίστοιχο χρονικό σημείο, παρατηρούμε πως στα περισσότερα δείγματα έχουμε απλώς μία ένδειξη για την ενεργότητα και ότι απαιτούνται περισσότερες μέρες για να έχουμε ένα ασφαλές συμπέρασμα μέσω κυτταροκαλλιέργειας.

Αυτά τα πέντε δείγματα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε PCR για 40 κύκλους με το εκκινητικό ζεύγος AN88/AN89, το οποίο όπως αναφέρθηκε παραπάνω στοχεύει στη VP1 γενωμική περιοχή των Εντεροϊών και χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίησή τους. Έτσι, αφού το προϊόν καθαρίστηκε και κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα, στάλθηκε για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για τα πέντε κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού έπειτα από Blastn παρουσιάζονται παρακάτω:

### ENY 1

Query: None Query ID: 1c1|Query\_6565 Length: 372

>Coxsackievirus B5 polyprotein gene for polyprotein, VP4 and VP2 and VP3 and VP1  
Sequence ID: LS451290.1 Length: 7366  
Range 1: 2497 to 2867

Score:603 bits(326), Expect:4e-168,  
Identities:356/371(96%), Gaps:0/371(0%), Strand: Plus/Plus

Query	1	CCAGCACTGACAGCAGTGGAGACGGGACACACGTCACAAGTTGTACCAGCAGACACAATG	60
Sbjct	2497	CCAGCCTTGACCGCCGAGAGACGGGACACACGTCACAAGTTGTACCAGCAGACACAATG	2556
Query	61	CAAACCAGACATGTGAAGAATTATCACTCAAGGTCGGAGTCAACAGTAGAGAACTTCTTG	120
Sbjct	2557	CAAACCAGACATGTGAAGAATTATCACTCAAGGTCGGAGTCAACAGTAGAGAACTTCTTG	2616
Query	121	TGCAGGTCTGCGTGTGTCTTTTACACCACATACAAGAACCATGATACTAACGGAGATAAC	180
Sbjct	2617	TGCAGGTCTGCGTGTGTCTTTTACACCACATACAAGAACCATGGTACTAACGGAGATAAC	2676
Query	181	TTTGCCTACTGGGTGATTAGCACACGACAAGTCGCCCAACTGCGCCGGAAGCTCGAAATG	240
Sbjct	2677	TTTGCCTACTGGGTGATTAGCACACGACAAGTCGCCCAACTGCGCCGGAAGCTCGAAATG	2736
Query	241	TCCACGTATGCAAGATTTGATTTGGAGTTAACCTTTGTAATCACAAGCACTCAGGAGCAA	300
Sbjct	2737	TTCACGTATGCAAGATTTGATTTGGAGTTAACCTTTGTAATCACAAGCACTCAGGAGCAA	2796
Query	301	TCTACCATTGAGGCCAAGACTCGCCAGTGCTCACTACCAAATTATGTTGTTCCACCA	360
Sbjct	2797	TCTACCATTGAGGCCAAGACTCGCCAGTGCTCACTACCAAATTATGTACGTACCTCCG	2856
Query	361	GGTGGTCCAGT	371
Sbjct	2857	GGCGGCCAGT	2867

## ENY 2

Query: None Query ID: 1c1|Query\_60281 Length: 378

>Human echovirus 30 isolate E30.2010Linyi.040T/ST capsid protein gene, partial cds  
Sequence ID: JF823639.1 Length: 876  
Range 1: 92 to 459

Score:597 bits(323), Expect:2e-166,  
Identities:353/368(96%), Gaps:0/368(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query   8      TGACAGCAGCTGAAACGGGACACACATCACAAGTAGTGCCGAGTGACACAATGCAAACAC   67
          ||||| || || |||||
Sbjct  92      TGACAGCAGTGGAGACAGGACACACATCACAAGTAGTACCGAGTGACACAATGCAAACAC   151

Query  68      GACACGTGATCAATTACCACACCAGATCAGAGTCATCAATAGAAAACTTATGGGTAGAG   127
          |||||
Sbjct 152      GACACGTGATCAATTACCACACCAGATCAGAGTCATCAATAGAAAACTTATGGGTAGAG   211

Query  128     CGGCGTGTGTGTACATCGCTCAATACGCCACTGAGAAGGTCAATGATGAGTTGGACAGGT   187
          |||||
Sbjct 212     CGGCGTGTGTGTACATCGCTCAATACGCCACTGAGAAGGTCAATGATGAGTTGGACAGGT   271

Query  188     AACTAACTGGGAGATAACAACCAGGCAAGTGGCGCAACTAAGGCGCAAGCTGGAGATGT   247
          |||||
Sbjct 272     AACTAACTGGGAGATAACAACCAGGCAAGTGGCGCAACTAAGGCGCAAGCTGGAAATGT   331

Query  248     TTACATACATGAGATTCGACCTTGAGATCACGTTAGTCATCACCAGCTCCCAGCGCACCT   307
          | |||||
Sbjct 332     TCACATACATGAGATTTGACCTTGAGATCACGTTGGTCATCACCAGCTCCCAGCGCACCT   391

Query  308     CAACCACATACGCGTCGGACTCCCCACCACTGACACACCAGGTAATGTACATTCCCCCAG   367
          |||||
Sbjct 392     CAACCACATACGCGTCGGACTCCCCACCACTGACACACCAGGTAATGTACGTACCACCGG   451

Query  368     GTGGTCCA   375
          | |||||
Sbjct 452     GAGGTCCA   459
```

#### ENY 4

Query: None Query ID: 1c1|Query\_9627 Length: 378

>Echovirus E30 isolate EFT/ATH/2018 VP1 gene, partial cds

Sequence ID: MK140815.1 Length: 357

Range 1: 3 to 357

Score:623 bits(337), Expect:3e-174,

Identities:349/355(98%), Gaps:0/355(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1 CCAGCACTGACAGCAGCTGAGATCGGACACACATCGCAAGTGGTACCGAGTGACACAATG 60
      |||||||
Sbjct 3 CCAGCACTGACAGCAGTGGAGACGGGACACACATCGCAAGTGGTACCGAGTGACACAATG 62

Query 61 CAGACACGACACGTGGTCAACTACCATACCAGATCAGAGTCATCAATAGAGAATTTTATG 120
      |||||||
Sbjct 63 CAGACACGACACGTGGTCAACTACCATACCAGATCAGAGTCATCAATAGAGAATTTTATG 122

Query 121 GGAAGAGCAGCGTGTGTGTATATCGCTCAGTATGCCACAGAGAAGGTCAATGACGAGTTG 180
      |||||||
Sbjct 123 GGAAGAGCAGCGTGTGTGTATATCGCTCAGTATGCCACAGAGAAGGTCAATGACGAGTTG 182

Query 181 GACAGGTACACTAATTGGGAAATAACAACCAGACAAGTGGCACAGCTGAGGCGCAAGCTG 240
      |||||||
Sbjct 183 GACAGGTACACTAATTGGGAAATAACAACCAGACAAGTGGCACAGCTGAGGCGCAAGCTA 242

Query 241 GAGATGTTTACATACATGAGGTTTGACCTAGAGGTCACGTTTGTATCACTAGTTCCCAG 300
      |||||||
Sbjct 243 GAGATGTTTACATACATGAGGTTTGACCTAGAGGTCACGTTTGTATCACTAGTTCCCAG 302

Query 301 CGCACTTCGACTACATACGCATCAGACTcccccccACTAACGCATCAGGTGATGT 355
      |||||||
Sbjct 303 CGCACTTCGACTACATACGCATCAGACTCCCCCCAATAACGCATCAGGTGATGT 357
```

## ENY 5

Query: None Query ID: 1c1|Query\_23809 Length: 366

>Human coxsackievirus B3 isolate 96HN+3/SD/CHN/1996 VP1 gene, partial cds  
Sequence ID: JQ364844.1 Length: 852  
Range 1: 85 to 450

Score:383 bits(207), Expect:5e-102,  
Identities:313/366(86%), Gaps:0/366(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1 CCAGCACTGACAGCAGCAGAGACTAGGCACACATCCCAAGTAGTCCCAGGGGATACCATG 60
      ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 85 CCAGCGCTCACCAGCTGAGACGGGGCATAACATCCCAGGTGGTTCAGGAGATACCATG 144

Query 61 CAAACGCGGCACGTGAAGAATTACCACTCAAGATCCGTGTCCACAATTGAAAATTCTTG 120
      ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 145 CAAACACGCCATGTGAAAAATTACCATTCAGATCTGAGTCAACAGTTGAGAACTTTTGT 204

Query 121 TGTAGGTCTGCCTGCGTTTACTTTACTGAGTATGAGAATTCAGGGTCCAGGCGATATGCC 180
      ||||| ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 205 TGTAGATCTGCTTGTGTCTACTTTACTGAGTATGAGAATTCAGGGTCCAAACGCTACGCC 264

Query 181 GAATGGGTGGTTTCAACACGCCAGGCAGCGCAGCTAAGGAGGAAGTTGGAGTTCTTTACG 240
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 265 GAATGGGTGGTTACAACACGACAGGCGGCACAGCTAAGGAGGAAGTTGGAGTTCTTACG 324

Query 241 TACATAAGGTTTGACCTGGAGCTTACCTTTGTTATTACAAGTACACAGCAACCTCTACA 300
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 325 TACATAAGATTTGACTTAGAGCTACCTTCGTCATTACGAGTACACAGCAACCTCTACA 384

Query 301 ACCCAAAACCAAGACGCACAGATCCTCACCCATCAGATCATGTTTCATGCCTCCAGGTGGT 360
      ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 385 ACCCAAAATCAGGATGCTCAGATCCTCACCCATCAGATCATGTATGTGCCACCAGGGGGC 444

Query 361 CCAGTA 366
      |||||
Sbjct 445 CCAGTA 450
```

## ENY 8

Query: None Query ID: 1c1|Query\_44287 Length: 378

Sequence ID: JF823640.1 Length: 876

>Human echovirus 30 isolate E30.2010Linyi.077CSF capsid protein gene, partial cds

Sequence ID: JF823644.1 Length: 876

Range 1: 85 to 459

Score:616 bits(333), Expect:5e-172,

Identities:361/375(96%), Gaps:0/375(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1 CCAGCACTGACAGCAGCGGAGACCGGACACACGTGACAGTAGTACCGAGTGACACAATG 60
      || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 85 CCTGCATTGACAGCAGTGGAGACAGGACACACATCACAAGTAGTACCGAGTGACACAATG 144

Query 61 CAAACACGACACGTGATCAACTACCACACTAGATCAGAGTCATCAATAGAAAACCTTTATG 120
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 145 CAAACACGACACGTGATCAACTACCACACCAGATCAGAGTCATCAATAGAAAACCTTTATG 204

Query 121 GGTAGGGCGGCGTGTGTGTACATCGCTCAATATGCCACTGAGAAAGTCAATGATGAGTTG 180
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 205 GGTAGAGCGGCGTGTGTGTACATCGCTCAATACGCCACTGAGAAAGTCAATGATGAGTTG 264

Query 181 GACAGGTGCACTAACTGGGAGATAACAACCAGGCAAGTGGCGCAACTAAGGCGCAAGCTG 240
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 265 GACAGGTACACTAACTGGGAGATAACAACCAGGCAAGTGGCGCAACTAAGGCGCAAGCTG 324

Query 241 GAAATGTTACATACATGAGATTTGACCTTGAGATCACGTTAGTCATCACCAGCTCCCAG 300
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 325 GAAATGTTACATACATGAGATTTGACCTCGAGATCACGTTAGTCATCACCAGCTCCCAG 384

Query 301 CGCACCTCAACCACATACGCGTCGGACTCCCCACCACTGACACACCAGGTGATGTACGTG 360
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 385 CGCACCTCAACCACATACGCGTCGGACTCCCCACCACTGACACACCAGGTGATGTACGTA 444

Query 361 CCACCAGGTGGTCCA 375
      ||||| || || |||
Sbjct 445 CCACCGGGAGGCCCA 459
```

Συνοψίζοντας από τα 15 κλινικά δείγματα που ελέγχθηκαν, 5 ήταν αυτά για τα οποία ανιχνεύθηκε και θετικός και αρνητικός κλώνος μετά από τρεις ανακαλλιέργειες σε κύτταρα Rd. Τα πέντε αυτά δείγματα μετά από αλληλούχηση και Blastn ταυτοποιήθηκαν και παρουσιάζονται συνολικά στον παρακάτω πίνακα. Οι αλληλουχίες τους κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων GenBank και τα accession numbers τους παρουσιάζονται επίσης στον πίνακα που ακολουθεί.

Κλινικό Δείγμα	Στέλεχος	Κωδικός GenBank
ENY 1	Coxsackievirus 5 (CVB5)	MW715805
ENY 2	Echovirus E30 (E30)	MW715806
ENY 4	Echovirus E30 (E30)	MW715807
ENY 5	Coxsackievirus 3 (CVB3)	MW715808
ENY 8	Echovirus E30 (E30)	MW715809

**Πίνακας 4.1.5.2:** Παρουσίαση των αποτελεσμάτων αλληλούχησης και κατά συνέπεια ταυτοποίησης των πέντε κλινικών δειγμάτων ENY.

## 4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

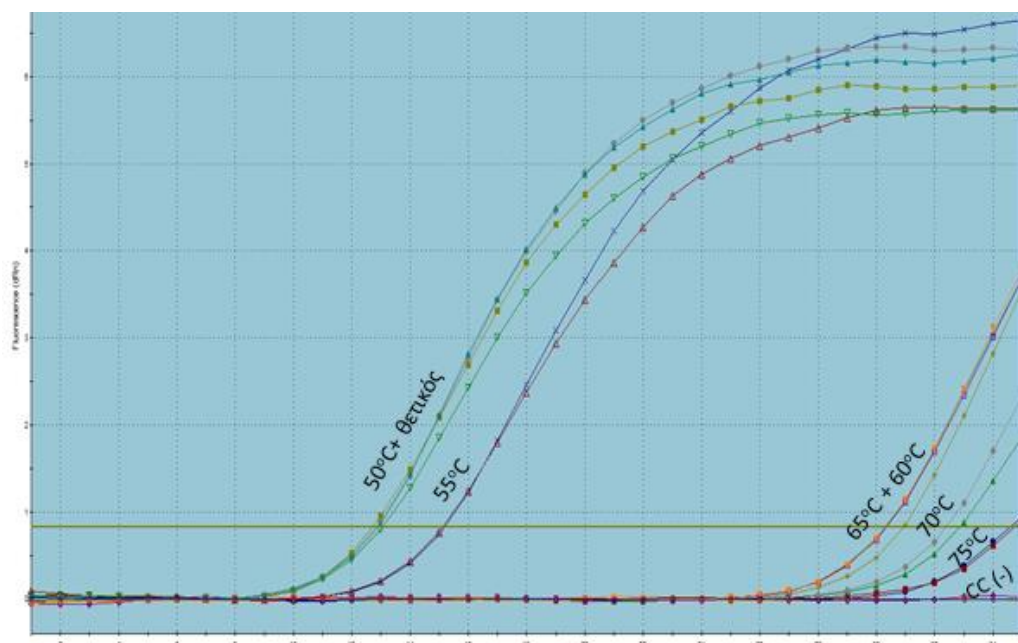
### 4.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ $10^6$ CCID<sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το στέλεχος Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> υποβλήθηκε αρχικά σε θερμική επεξεργασία στους 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C και 75°C, με σκοπό να βρεθεί η κατάλληλη θερμοκρασία για την πλήρη αδρανοποίησή του. Στον πίνακα 4.2.1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την παρατήρηση CPE μετά την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους Sabin 1 σε κύτταρα Rd έως τους 75°C και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες, όπου φαίνεται ότι μέχρι τους 75°C δεν έχει επιτευχθεί αδρανοποίηση του ιού.

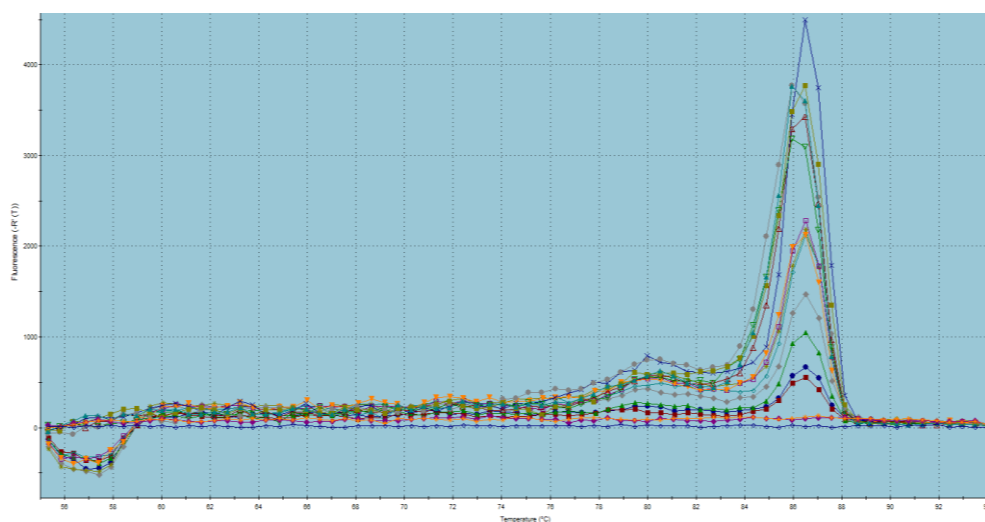
Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
S1 [ $10^6$ ] 50°C (1)	1+	4+			
S1 [ $10^6$ ] 50°C (2)	1+	4+			
S1 [ $10^6$ ] 55°C (1)	-	-	1+	2+	3+
S1 [ $10^6$ ] 55°C (2)	-	-	1+	2+	3+
S1 [ $10^6$ ] 60°C (1)	-	-	-	-/1+	2+
S1 [ $10^6$ ] 60°C (2)	-	-	-	-/1+	2+
S1 [ $10^6$ ] 65°C (1)	-	-	-	-/1+	2+
S1 [ $10^6$ ] 65°C (2)	-	-	-	-/1+	2+
S1 [ $10^6$ ] 70°C (1)	-	-	-	-	1+
S1 [ $10^6$ ] 70°C (2)	-	-	-	-	1+
S1 [ $10^6$ ] 75°C (1)	-	-	-	-	1+
S1 [ $10^6$ ] 75°C (2)	-	-	-	-	1+
S1 [ $10^6$ ] (+)	4+				
S1 [ $10^6$ ] (+)	4+				

**Πίνακας 4.2.1.1:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες 50 έως 75°C του S1  $10^6$  CCID<sub>50</sub>.





**Εικόνα 4.2.1.1** Amplification Plot του στελέχους S1  $10^6$  CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 50 έως τους 75°C, όπου φαίνεται πως παρόλο που έχει μειωθεί η συγκέντρωση του ιού μετά τη θέρμανση, δεν έχει επιτευχθεί πλήρης αδρανοποίηση σε καμία θερμοκρασία.

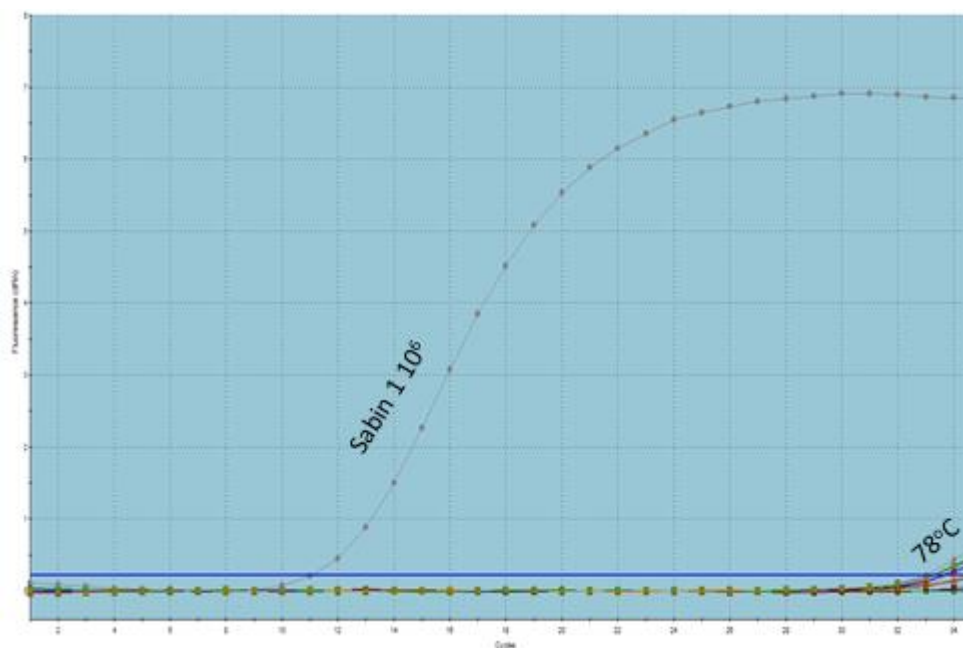


**Εικόνα 4.2.1.2** Dissociation Curve του στελέχους S1  $10^6$  CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 50 έως τους 75°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

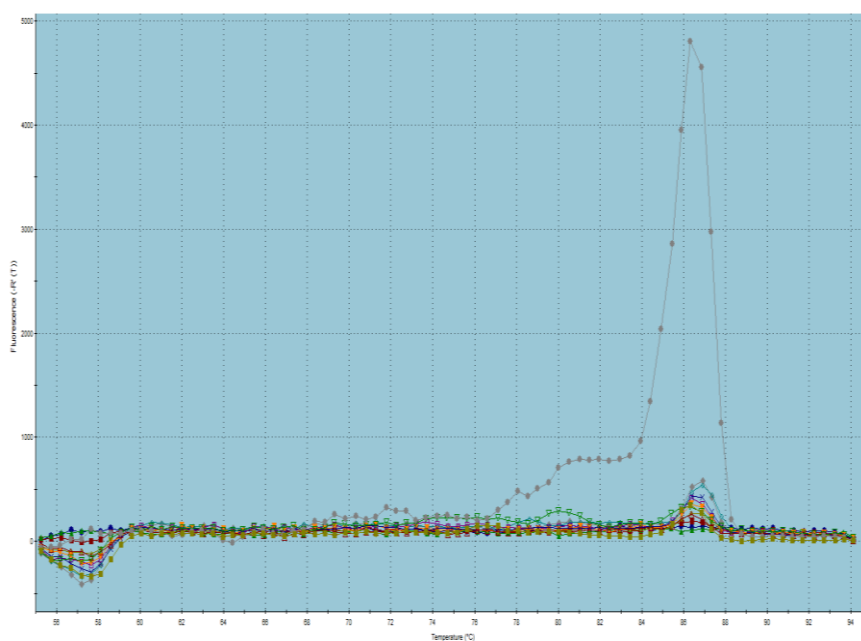
Αφού διαπιστώθηκε πως έως τους 75°C είχε απλώς ελαττωθεί η συγκέντρωση του ιού και δεν είχε επιτευχθεί πλήρης αδρανοποίησή του, προχωρήσαμε σε θερμική επεξεργασία στις υψηλότερες θερμοκρασίες 78°C, 80°C και 82°C. Τα αποτελέσματα από την παρατήρηση εμφάνισης CPE έπεται από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους Sabin 1 σε κύτταρα Rd έως τους 82°C, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.1.2. Έπειτα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες, όπου φαίνεται ότι πλήρης αδρανοποίηση του ιού επιτυγχάνεται μεταξύ 80-82°C, καθώς το γονιδίωμα του στελέχους S1 δεν ανιχνεύεται από τους 80 βαθμούς και πάνω στην 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια.

Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
S1 [10 <sup>6</sup> ] 78°C (1)	-	-	-	-	1+
S1 [10 <sup>6</sup> ] 78°C (2)	-	-	-	-	1+
S1 [10 <sup>6</sup> ] 80°C (1)	-	-	-	-	-
S1 [10 <sup>6</sup> ] 80°C (2)	-	-	-	-	-
S1 [10 <sup>6</sup> ] 82°C (1)	-	-	-	-	-
S1 [10 <sup>6</sup> ] 82°C (2)	-	-	-	-	-
S1 [10 <sup>6</sup> ] (+)	4+				
S1 [10 <sup>6</sup> ] (+)	4+				

**Πίνακας 4.2.1.2:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες επεξεργασίας 78 έως 82°C του S1 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.2.1.3** Amplification Plot του στελέχους S1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 78 έως τους 82°C, όπου φαίνεται πως πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται μεταξύ 80-82°C.



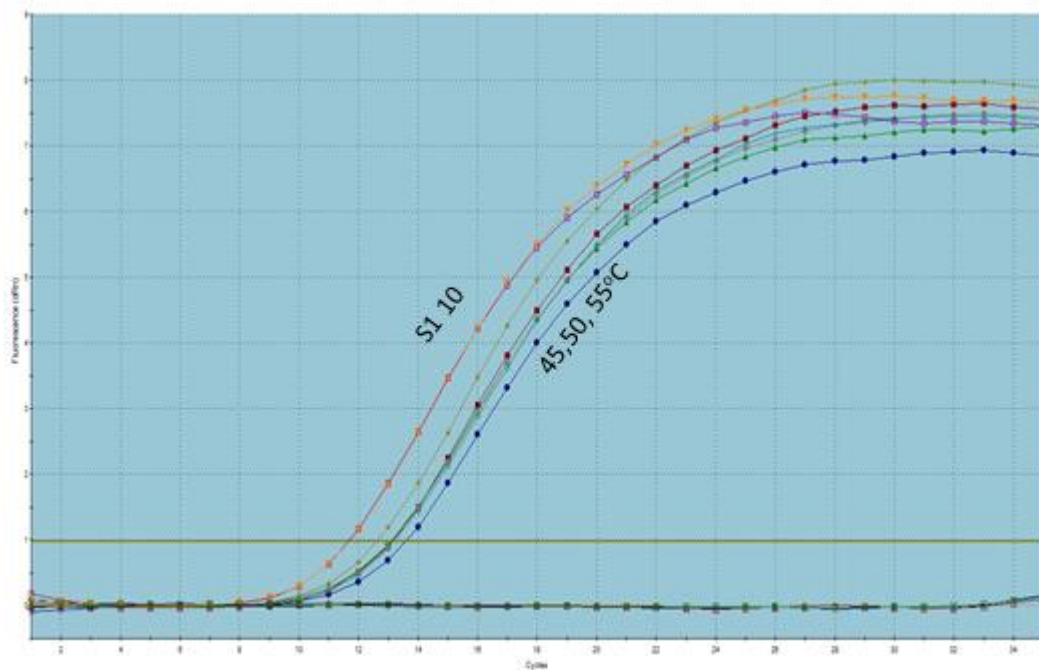
**Εικόνα 4.2.1.4** Dissociation Curve του στελέχους S1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 78 έως τους 82°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

#### 4.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ SABIN 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID<sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

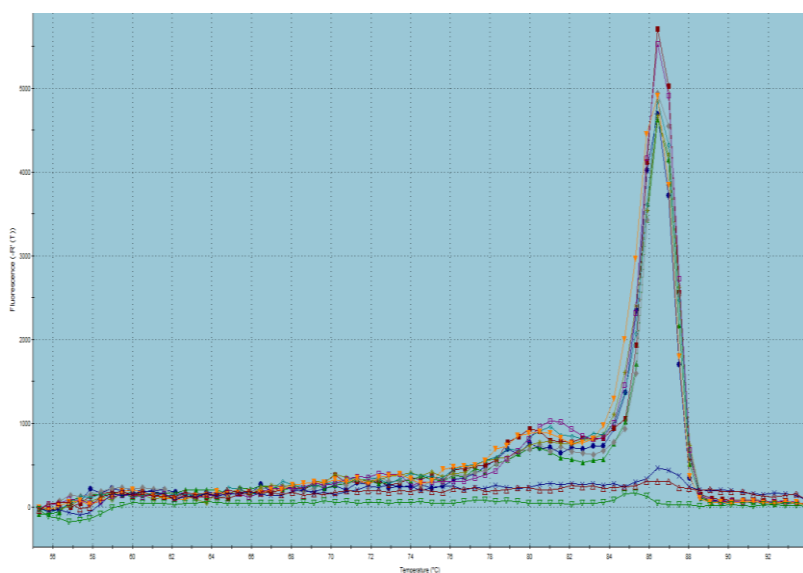
Το στέλεχος Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub> υποβλήθηκε αρχικά σε θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C και 55°C, με σκοπό να βρεθεί η κατάλληλη θερμοκρασία για την πλήρη αδρανοποίησή του. Στον πίνακα 4.2.2.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την παρατήρηση CPE μετά την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους Sabin 1 σε κύτταρα Rd στις προαναφερθείσες θερμοκρασίες και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν διαπιστώνεται ότι σε αυτές τις θερμοκρασίες όχι μόνο δεν επιτυγχάνεται αδρανοποίηση του ιού, αλλά ούτε και μειώνεται η συγκέντρωση του συγκριτικά με το μη επεξεργασμένο S1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>.

Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
S1 [10] 45°C (1)	-	-	2+	3+	4+
S1 [10] 45°C (2)	-	-	2+	3+	4+
S1 [10] 50°C (1)	-	-	2+	3+	4+
S1 [10] 50°C (2)	-	-	2+	3+	4+
S1 [10] 55°C (1)	-	-	1+	2+	3+
S1 [10] 55°C (2)	-	-	1+	2+	3+
S1 [10] (+)	-	1+	4+		
S1 [10] (+)	-	1+	4+		

**Πίνακας 4.2.2.1:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες 45 έως 55°C του S1 [10] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.2.2.1** Amplification Plot του στελέχους S1 [10] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 45 έως τους 55°C, όπου φαίνεται πως δεν έχει επιτευχθεί αδρανοποίηση σε καμία θερμοκρασία. Να σημειωθεί ότι ο θετικός μάρτυρας είναι S1 [10]CCID<sub>50</sub> μετά από μόλυνση για 4 ημέρες σε κύτταρα Rd.

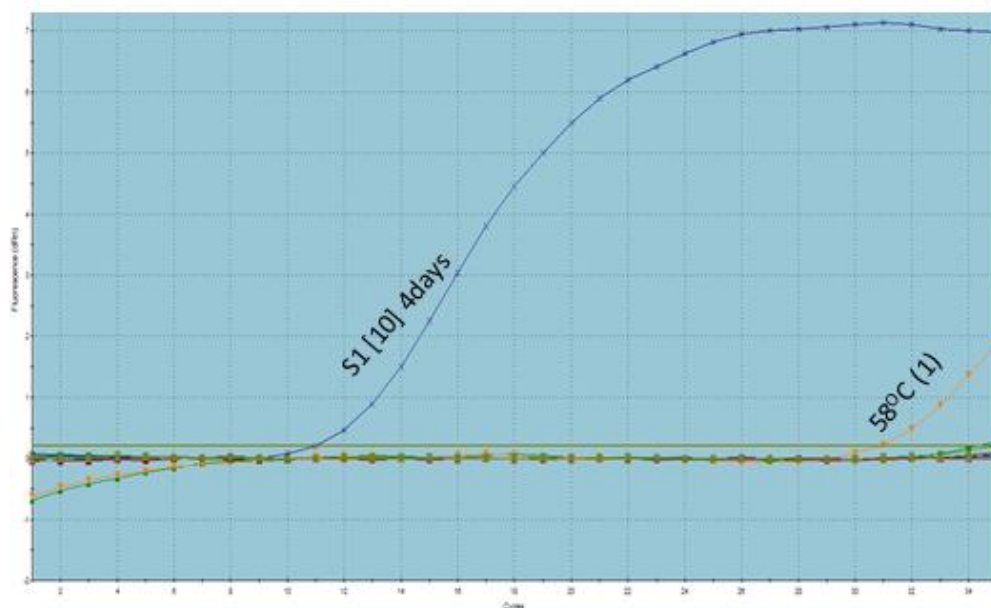


**Εικόνα 4.2.2.2** Dissociation Curve του στελέχους S1 [10] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 45 έως τους 55°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

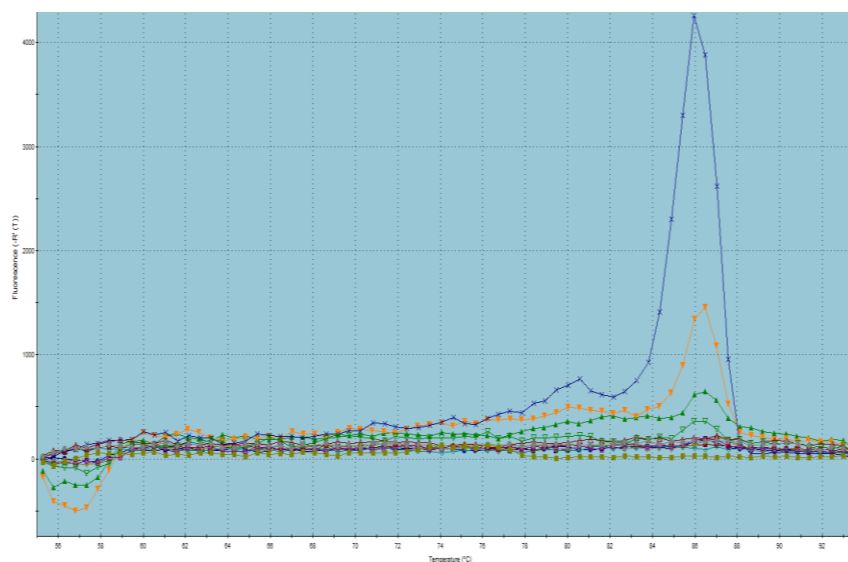
Αφού διαπιστώθηκε πως έως τους 55°C δεν είχε επιτευχθεί αδρανοποίησή του ιού, προχωρήσαμε σε θερμική επεξεργασία στις υψηλότερες θερμοκρασίες 58°C, 60°C, 65°C και 70°C. Τα αποτελέσματα από την παρατήρηση εμφάνισης CPE έπειτα από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους Sabin 1 σε κύτταρα Rd έως τους 70°C παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.2.2. Έπειτα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες, όπου φαίνεται ότι πλήρης αδρανοποίηση του ιού επιτυγχάνεται από τους 60°C και πάνω, καθώς το γονιδίωμα του στελέχους S1 δεν ανιχνεύεται από τους 60 βαθμούς και πάνω στην 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια.

Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
S1 [10] 58°C (1)	-	-	-	-	1-2+
S1 [10] 58°C (2)	-	-	-	-	1-2+
S1 [10] 60°C (1)	-	-	-	-	-
S1 [10] 60°C (2)	-	-	-	-	-
S1 [10] 65°C (1)	-	-	-	-	-
S1 [10] 65°C (2)	-	-	-	-	-
S1 [10] 70°C (1)	-	-	-	-	-
S1 [10] 70°C (2)	-	-	-	-	-
S1 [10] (+)	-	1+	2-3+	4+	
S1 [10] (+)	-	1+	3+	4+	

**Πίνακας 4.2.2.2:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες 60 έως 70°C του S1 [10] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.2.2.3** Amplification Plot του στελέχους S1 [10] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 60 έως τους 70°C, όπου φαίνεται πως πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται από τους 60 βαθμούς και πάνω.



**Εικόνα 4.2.2.4** Dissociation Curve του στελέχους S1 [10] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 60 έως τους 70°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

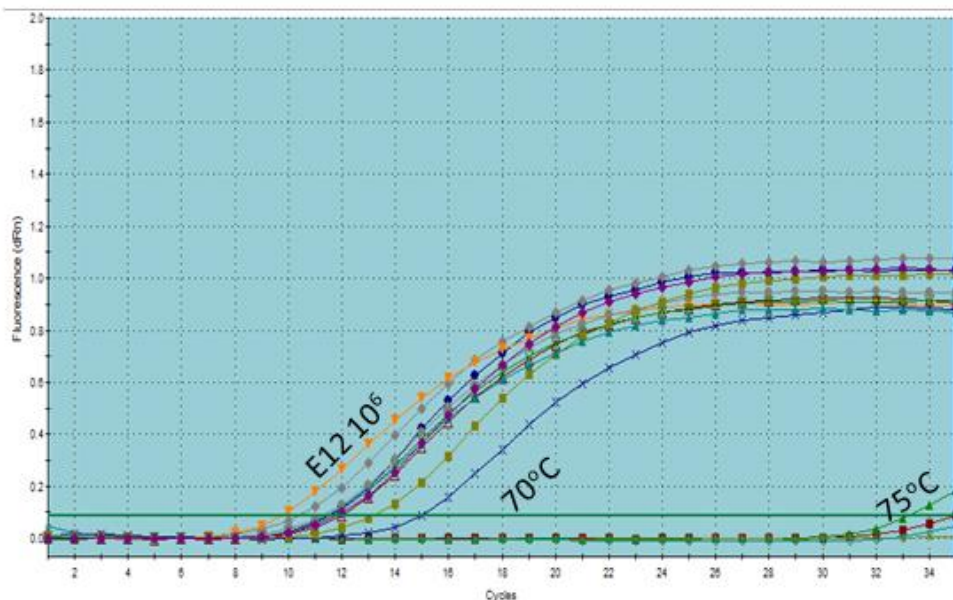
#### 4.2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ $10^6$ CCID<sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το στέλεχος Echo 12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> υποβλήθηκε αρχικά σε θερμική επεξεργασία στους 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C και 75°C, με σκοπό να βρεθεί η κατάλληλη θερμοκρασία για την πλήρη αδρανοποίησή του. Στον πίνακα 4.2.3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την παρατήρηση CPE μετά την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους E12 σε κύτταρα Rd έως τους 75°C και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες, όπου φαίνεται ότι μέχρι τους 75°C δεν έχει επιτευχθεί αδρανοποίηση του ιού.

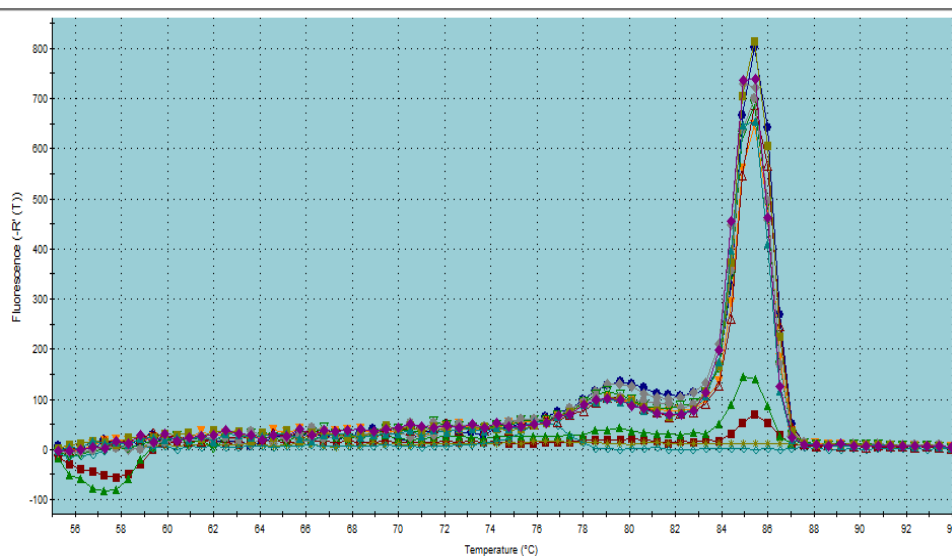
Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
E12 [ $10^6$ ] 50°C (1)	1+	4+			
E12 [ $10^6$ ] 50°C (2)	1+	4+			
E12 [ $10^6$ ] 55°C (1)	-	2+	4+		
E12 [ $10^6$ ] 55°C (2)	-	2+	4+		
E12 [ $10^6$ ] 60°C (1)	-	2+	3+	4+	
E12 [ $10^6$ ] 60°C (2)	-	2+	3+	4+	
E12 [ $10^6$ ] 65°C (1)	-	1+	2+	4+	
E12 [ $10^6$ ] 65°C (2)	-	1+	2+	4+	
E12 [ $10^6$ ] 70°C (1)	-	-	1+	3+	4+
E12 [ $10^6$ ] 70°C (2)	-	-	-	2+	4+
E12 [ $10^6$ ] 75°C (1)	-	-	1+	2+	3+
E12 [ $10^6$ ] 75°C (2)	-	-	1+	3+	3+
E12 [ $10^6$ ] (+)	4+				
E12 [ $10^6$ ] (+)	4+				

**Πίνακας 4.2.3.1:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες 50 έως 75°C του E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub>.





**Εικόνα 4.2.3.1** Amplification Plot του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 50 έως τους 75°C, όπου φαίνεται πως δεν έχει επιτευχθεί πλήρης αδρανοποίηση σε καμία θερμοκρασία, καθώς βλέπουμε ότι το γονιδίωμα του ιού ανιχνεύεται κανονικά.

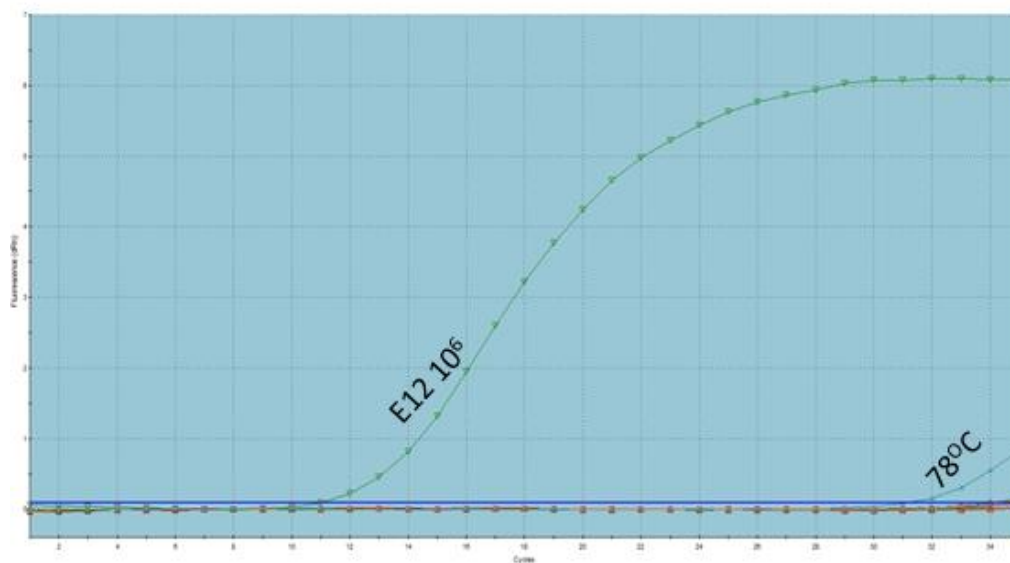


**Εικόνα 4.2.3.2** Dissociation Curve του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 50 έως τους 75°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

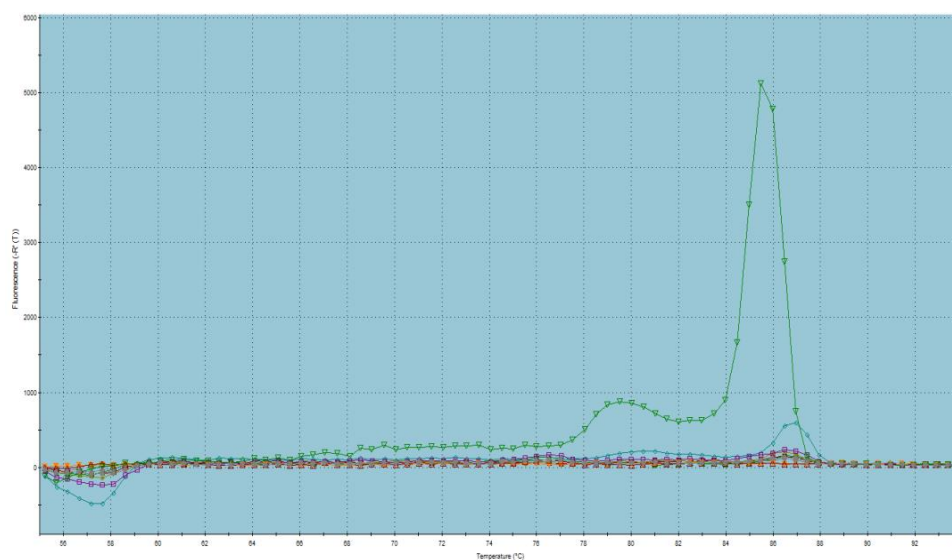
Αφού διαπιστώθηκε πως έως τους 75°C δεν είχε επιτευχθεί αδρανοποίησή του ιικού στελέχους, προχωρήσαμε σε θερμική επεξεργασία στις υψηλότερες θερμοκρασίες 78°C, 80°C και 82°C. Τα αποτελέσματα από την παρατήρηση εμφάνισης CPE μετά την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους E12 σε κύτταρα Rd έως τους 82°C παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.3.2. Έπειτα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες, όπου φαίνεται ότι πλήρης αδρανοποίηση του ιού επιτυγχάνεται μεταξύ 80-82°C, καθώς το γονιδίωμα του στελέχους E12 δεν ανιχνεύεται από τους 80 βαθμούς και πάνω στην 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και για το στέλεχος Sabin 1.

Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
E12 [10 <sup>6</sup> ] 78°C (1)	-	-	1+	1+	2+
E12 [10 <sup>6</sup> ] 78°C (2)	-	-	-	-	1+
E12 [10 <sup>6</sup> ] 80°C (1)	-	-	-	-	-
E12 [10 <sup>6</sup> ] 80°C (2)	-	-	-	-	-
E12 [10 <sup>6</sup> ] 82°C (1)	-	-	-	-	-
E12 [10 <sup>6</sup> ] 82°C (2)	-	-	-	-	-
E12 [10 <sup>6</sup> ] (+)	4+				
E12 [10 <sup>6</sup> ] (+)	4+				

**Πίνακας 4.2.3.2:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες 78 έως 82°C του E12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.2.3.3** Amplification Plot του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 78 έως τους 82°C, όπου φαίνεται πως πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται μεταξύ 80-82°C.



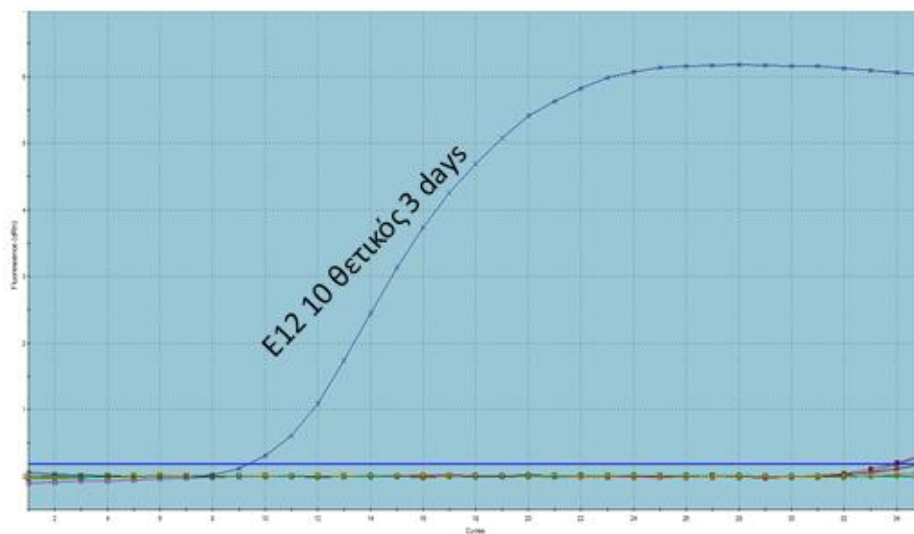
**Εικόνα 4.2.3.4** Dissociation Curve του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 78 έως τους 82°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

#### 4.2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ CPE ΚΑΙ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ECHO 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 10 CCID<sub>50</sub> ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

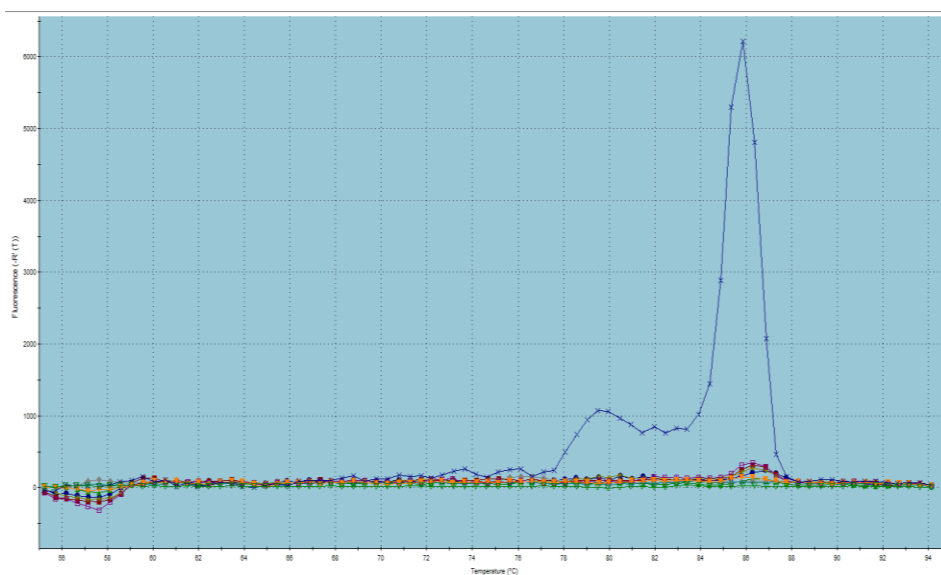
Με βάση τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, το στέλεχος E12 υποβλήθηκε απευθείας σε θερμική επεξεργασία στις θερμοκρασίες 55°C, 58°C, 60°C και 65°C. Στον πίνακα 4.2.4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την παρατήρηση CPE έπειτα από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του θερμικά επεξεργασμένου στελέχους Echo 12 [10] CCID<sub>50</sub> σε κύτταρα Rd στις προαναφερθείσες θερμοκρασίες και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR για τις ίδιες θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν διαπιστώνεται ότι το γονιδίωμα του ιού σε αυτή τη συγκέντρωση δεν ανιχνεύεται από τους 55 βαθμούς και πάνω. Για να εντοπίσουμε έως ποια θερμοκρασία ανιχνεύεται, δοκιμάσαμε και χαμηλότερες θερμοκρασίες με την ίδια διαδικασία, όπου φάνηκε πως το E12 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> ανιχνεύεται έως τους 45°C μετά την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια σε κύτταρα Rd.

Δείγμα	1 <sup>η</sup> μέρα	2 <sup>η</sup> μέρα	3 <sup>η</sup> μέρα	4 <sup>η</sup> μέρα	5 <sup>η</sup> μέρα
C.C Rd (1)	-	-	-	-	-
C.C Rd (2)	-	-	-	-	-
E12 [10] 55°C (1)	-	-	-	-	-
E12 [10] 55°C (2)	-	-	-	-	-
E12 [10] 58°C (1)	-	-	-	-	-
E12 [10] 58°C (2)	-	-	-	-	-
E12 [10] 60°C (1)	-	-	-	-	-
E12 [10] 60°C (2)	-	-	-	-	-
E12 [10] 65°C (1)	-	-	-	-	-
E12 [10] 65°C (2)	-	-	-	-	-
E12 [10] (+)	-	2+	4+		
E12 [10] (+)	-	2+	4+		

**Πίνακας 4.2.4.1:** Εμφάνιση CPE στις θερμοκρασίες 55 έως 65°C του E12 [10] CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.2.4.1** Amplification Plot του στελέχους E12 [10] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 55 έως τους 65°C, όπου φαίνεται πως πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται από τους 55°C, καθώς ανιχνεύεται μόνο ο θετικός μάρτυρας της αντίδρασης.

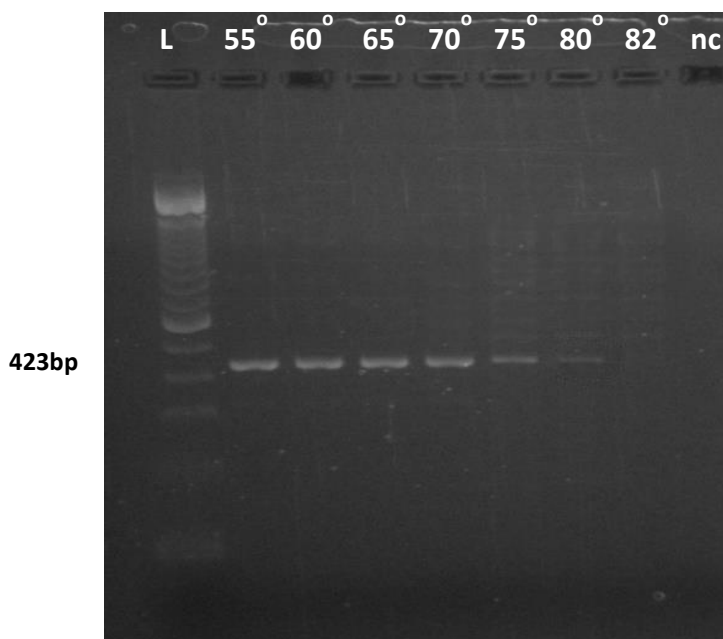


**Εικόνα 4.2.4.2** Dissociation Curve του στελέχους E12 [10] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 55 έως τους 65°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

## 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

### 4.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5'UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

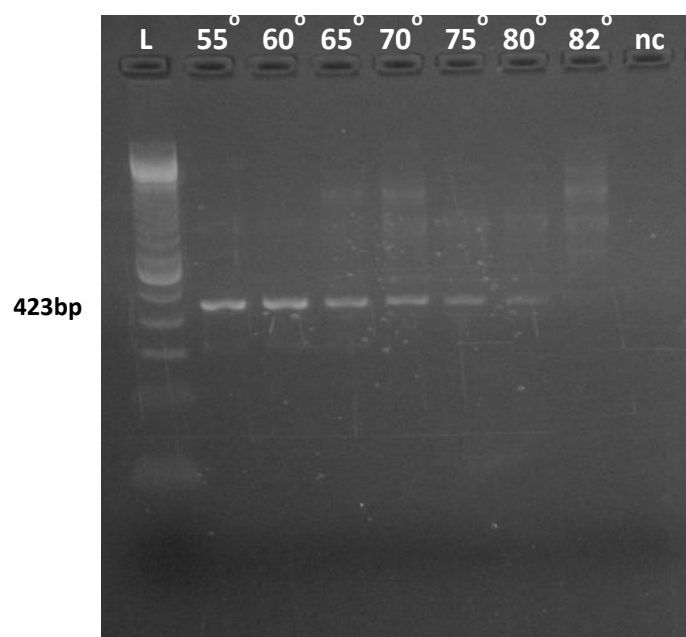
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στη συντηρημένη περιοχή 5'UTR για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι τη θερμοκρασία των 80°C, ενώ στους 82°C φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Sabin 1 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 82 βαθμών και του αρνητικού μάρτυρα. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 423 bp.



**Εικόνα 4.3.1.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Sabin 1 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5'UTR ΣΤΟ ECHO 12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

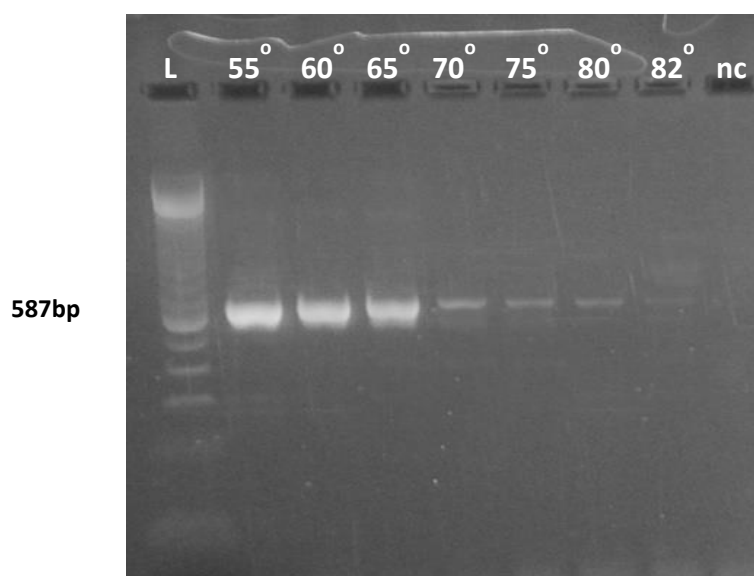
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στη συντηρημένη περιοχή 5'UTR για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι τη θερμοκρασία των 80°C, ενώ στους 82°C φαίνεται πως υφίσταται βλάβη, ακριβώς όπως και για το στέλεχος Sabin 1. Στην εικόνα 4.3.2.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος E12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 82 βαθμών και του αρνητικού μάρτυρα. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 423 bp.



**Εικόνα 4.3.2.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Echo 12 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ SABIN 1[10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3C για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι και τη θερμοκρασία των 82°C, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν επηρεάζεται από τη θερμική επεξεργασία έως και αυτή τη θερμοκρασία. Στην εικόνα 4.3.3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το στέλεχος Sabin 1 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub> για την ενίσχυση τμήματος της 3C έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου παρατηρούμε την ύπαρξη της ειδικής ζώνης σε όλες τις θερμοκρασίες πλην του αρνητικού μάρτυρα. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 587 bp.

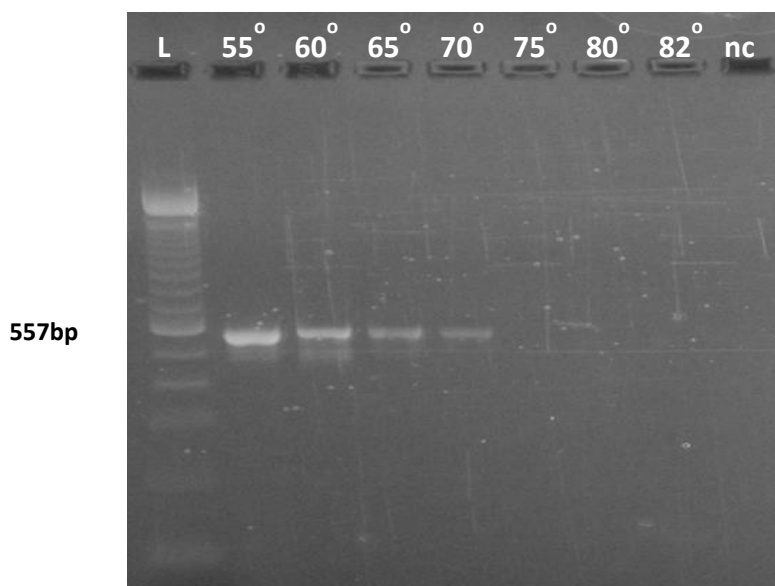


**Εικόνα 4.3.3.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Sabin 1 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.



#### 4.3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ ECHO 12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

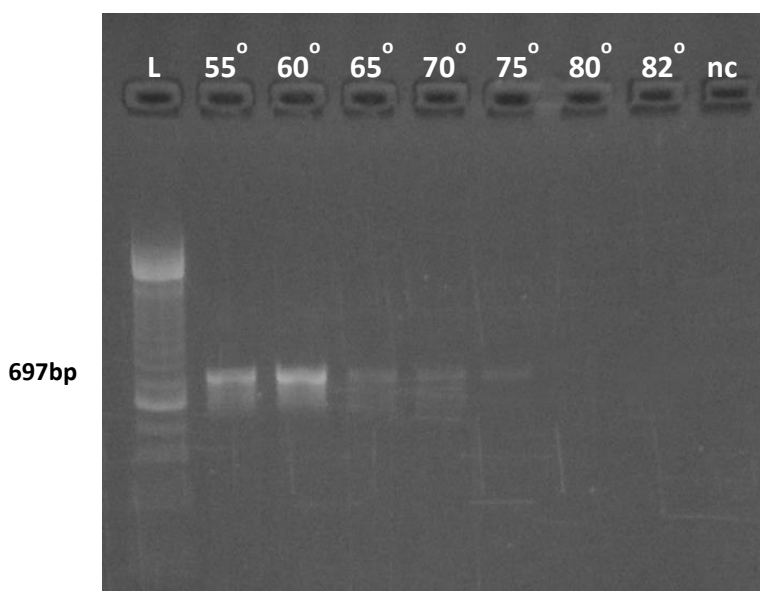
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3C για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι τη θερμοκρασία των 70°C, ενώ από τους 75°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος E12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται από τους 70°C και κάτω. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 557 bp.



**Εικόνα 4.3.4.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Echo 12 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ SABIN 1[10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

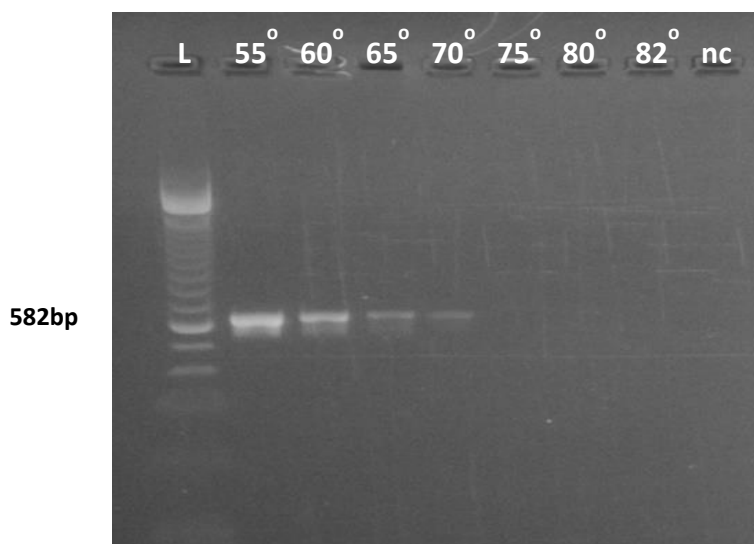
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3D για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι και τη θερμοκρασία των 75°C, ενώ από τους 80°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το στέλεχος Sabin 1 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub> για την ενίσχυση τμήματος της 3D έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 80 και 82°C, καθώς και του αρνητικού μάρτυρα. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 697 bp.



**Εικόνα 4.3.5.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από την ενίσχυση τμήματος της 3D για το στέλεχος Sabin 1 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ ECHO 12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

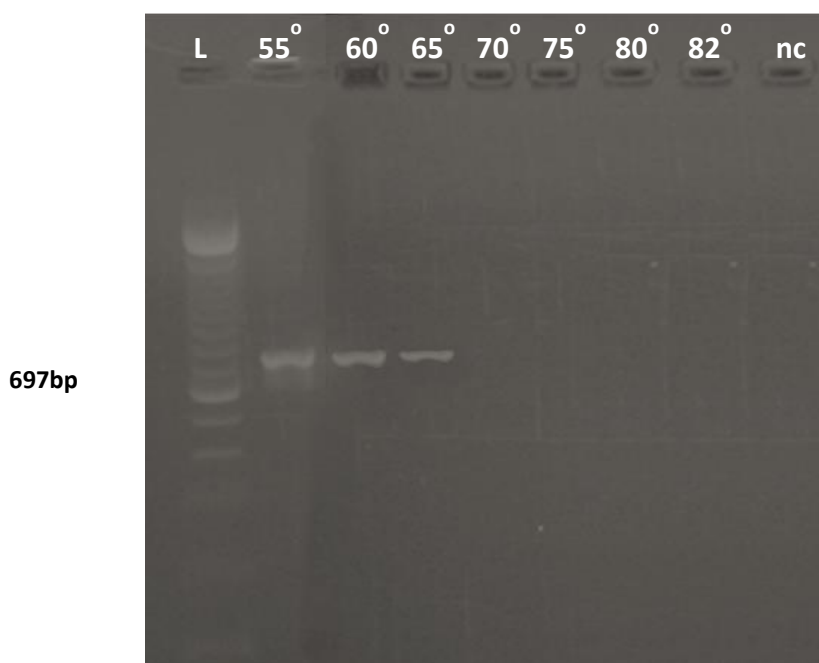
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3D για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι και τη θερμοκρασία των 70°C, ενώ από τους 75°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.6.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το στέλεχος E12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub> από την ενίσχυση τμήματος της 3D έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται από τους 70°C και κάτω. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 582bp.



**Εικόνα 4.3.6.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από την ενίσχυση τμήματος της 3D για το στέλεχος Echo 12 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

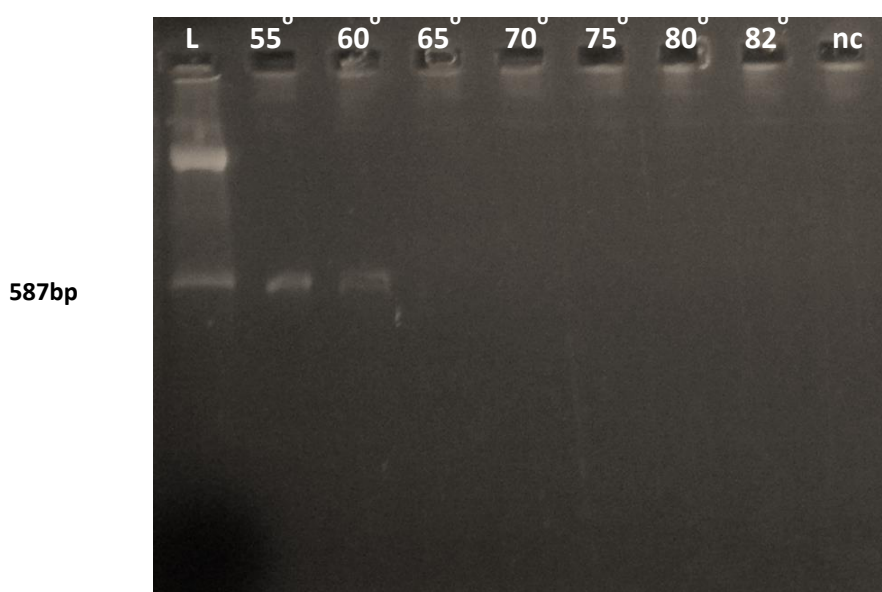
#### 4.3.7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3'UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3'UTR στοχεύοντας την 3D περιοχή για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι και τη θερμοκρασία των 65°C, ενώ από τους 70°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.7.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το στέλεχος Sabin 1 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub> για τον έλεγχο της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας τμήμα της 3D περιοχής έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται από τους 65°C και κάτω. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 697 bp.



**Εικόνα 4.3.7.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από τον έλεγχο ακεραιότητας της 3'UTR στοχεύοντας την 3D για το στέλεχος Sabin 1 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

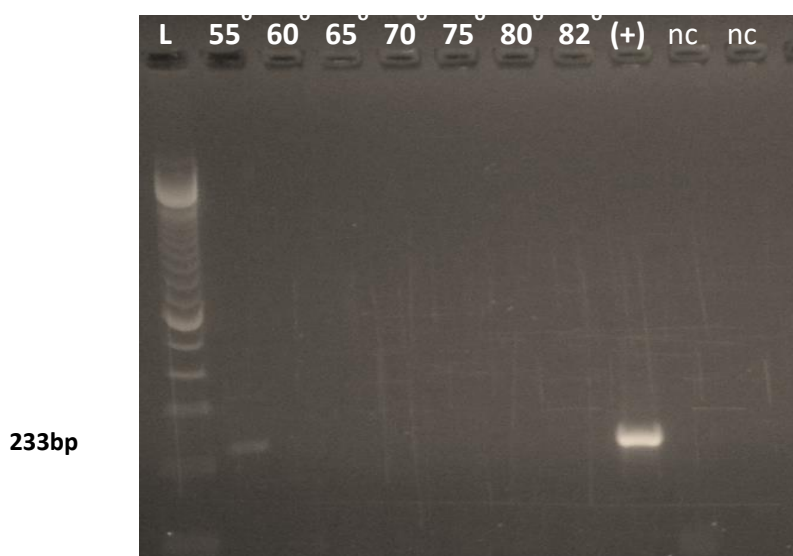
Όσον αφορά τον έλεγχο της ακεραιότητας της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας την 3C γενωμική περιοχή για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10^6$  CCID<sub>50</sub>, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι και τη θερμοκρασία των 60°C, ενώ από τους 65°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.7.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για το στέλεχος Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> για τον έλεγχο της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας τμήμα της 3C περιοχής έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται από τους 60°C και κάτω. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 587 bp.



**Εικόνα 4.3.7.2:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από τον έλεγχο ακεραιότητας της 3'UTR στοχεύοντας την 3C για το στέλεχος Sabin 1  $10^6$  CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

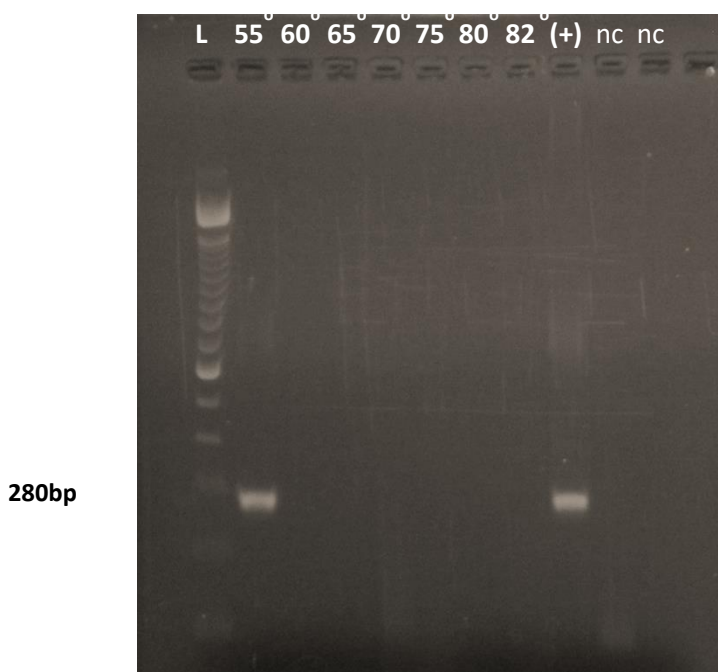
#### 4.3.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3'UTR ΣΤΟ ECHO 12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub>

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3'UTR στοχεύοντας την 3D περιοχή για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια στη θερμοκρασία των 55 °C, ενώ από τους 60°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.8.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για το στέλεχος Echo 12 [10<sup>6</sup>] CCID<sub>50</sub> για τον έλεγχο της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας τμήμα της 3D περιοχής έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται αποκλειστικά στους 55°C. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 233 bp.



**Εικόνα 4.3.8.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR από τον έλεγχο ακεραιότητας της 3'UTR στοχεύοντας την 3D για το στέλεχος Echo 12 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

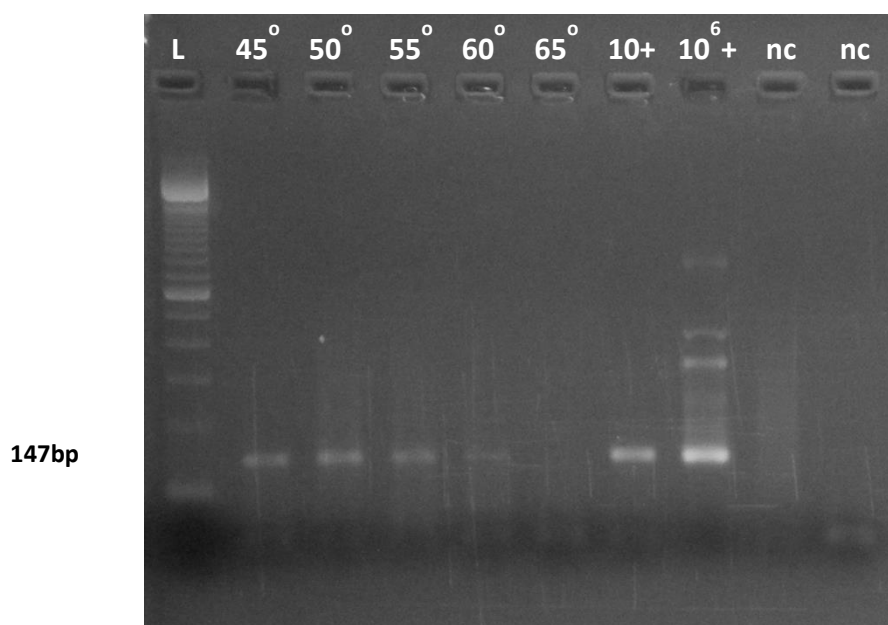
Όσον αφορά τον έλεγχο της ακεραιότητας της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας την 3C γενωμική περιοχή για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης  $10^6$  CCID<sub>50</sub>, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια επίσης στη θερμοκρασία των 55°C, ενώ από τους 60°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.8.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για το στέλεχος Echo 12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> για τον έλεγχο της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας τμήμα της 3C περιοχής έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται μόνο στους 55°C, όπως αποδείχτηκε στοχεύοντας και την 3D περιοχή. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 280 bp.



**Εικόνα 4.3.8.2:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR από τον έλεγχο ακεραιότητας της 3'UTR στοχεύοντας την 3C για το στέλεχος Echo 12  $10^6$  CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5'UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID<sub>50</sub>

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στη συντηρημένη περιοχή 5'UTR για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι τη θερμοκρασία των 60°C, ενώ στους 65°C φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.9.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 65 βαθμών και των αρνητικών μαρτύρων. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 147 bp.

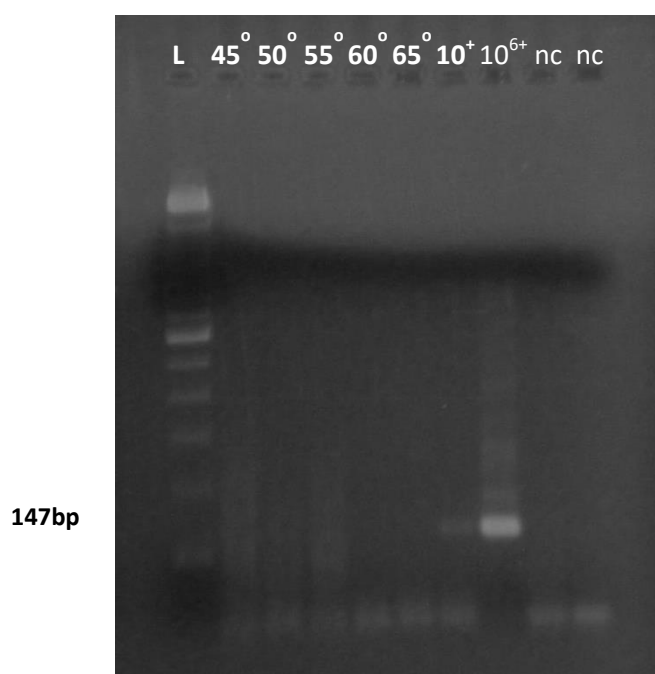


**Εικόνα 4.3.9.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Sabin 1 10 CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.



#### 4.3.10 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 5'UTR ΣΤΟ ECHO 12 [10] CCID<sub>50</sub>

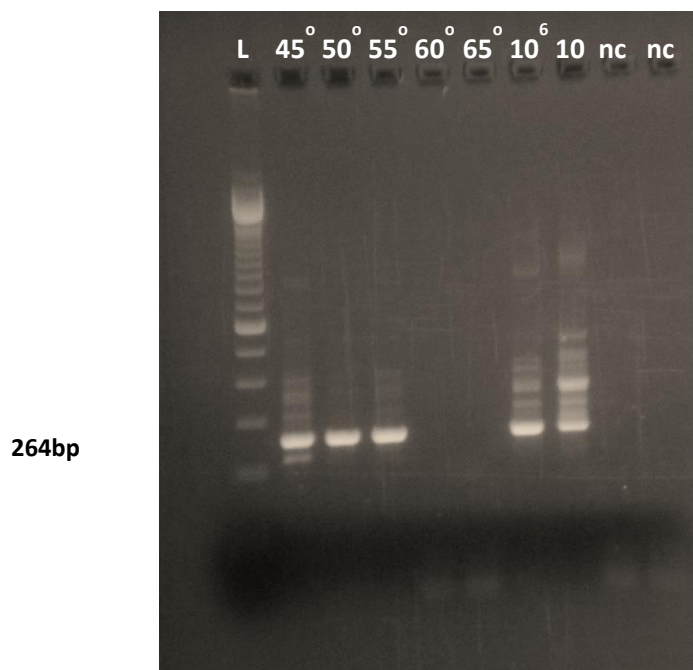
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στη συντηρημένη περιοχή 5'UTR για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή δεν παραμένει ακέραια σε καμία από τις θερμοκρασίες επεξεργασίας. Στην εικόνα 4.3.10.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Echo 12 [10] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται μόνο στους θετικούς μάρτυρες της αντίδρασης. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 147bp.



**Εικόνα 4.3.10.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 5'UTR για το στέλεχος Echo 12 10 CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.11 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>

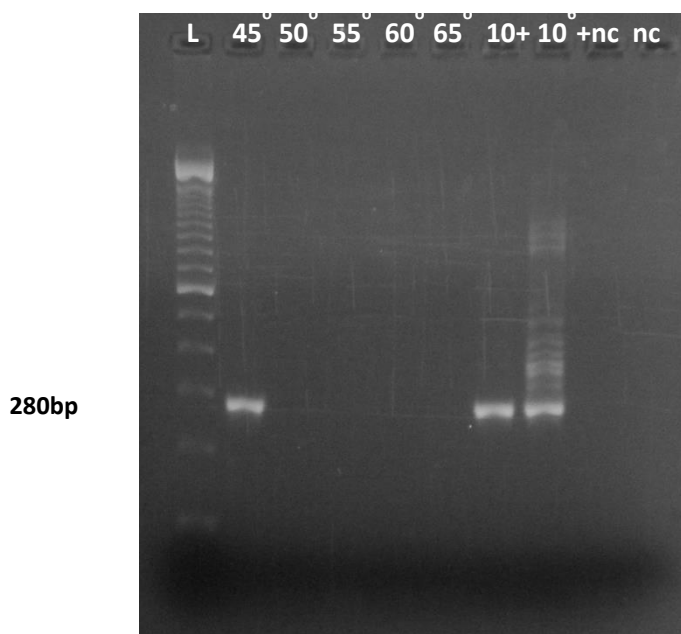
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3C για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι τη θερμοκρασία των 55°C, ενώ στους 60°C φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.11.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 60 και 65 βαθμών και των αρνητικών μαρτύρων. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 264 bp.



**Εικόνα 4.3.11.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Sabin 1 10 CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.12 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C ΣΤΟ ECHO 12 [10] CCID<sub>50</sub>

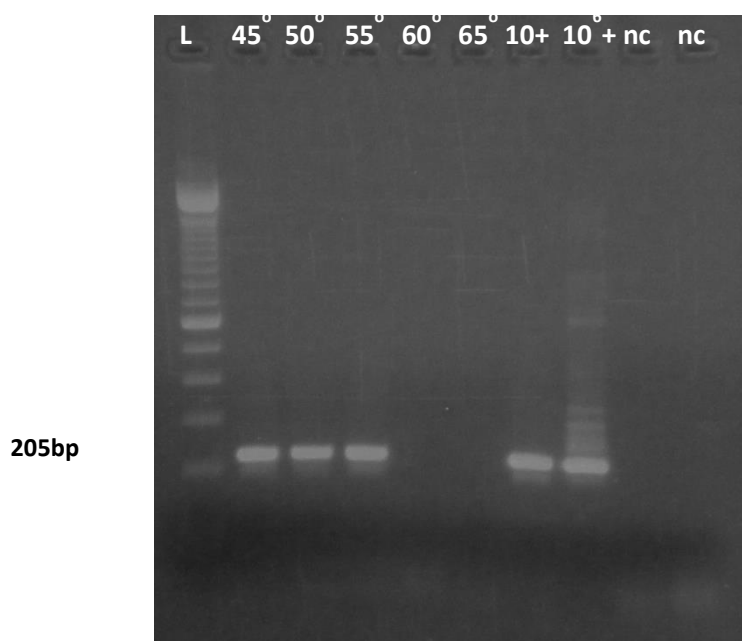
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3C για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μόνο στη θερμοκρασία των 45° C από τις θερμοκρασίες επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν. Στην εικόνα 4.3.12.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Echo 12 [10] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται μόνο στους 45°C και στους θετικούς μάρτυρες της αντίδρασης. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 280 bp.



**Εικόνα 4.3.12.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Echo 12 10 CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.13 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID<sub>50</sub>

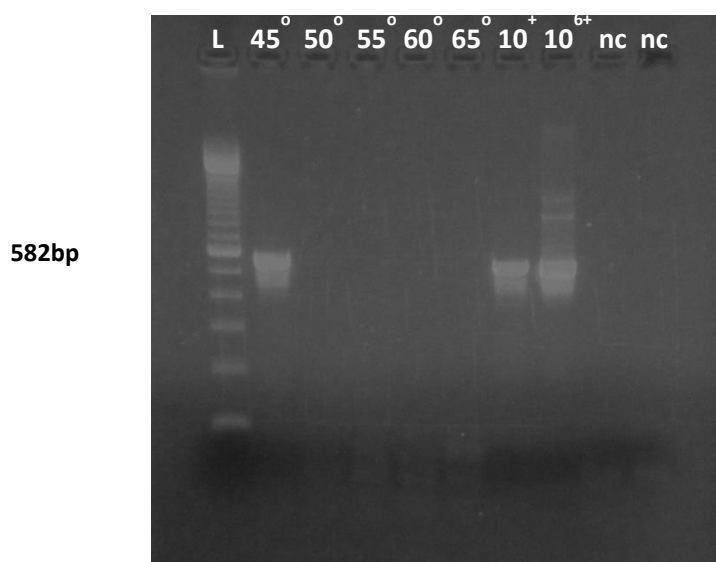
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3D για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μέχρι τη θερμοκρασία των 55°C, ενώ στους 60°C φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.13.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR για την ενίσχυση τμήματος της 3D για το στέλεχος Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 60 και 65 βαθμών και των αρνητικών μαρτύρων. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 205 bp.



**Εικόνα 4.3.13.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 3D για το στέλεχος Sabin 1 10 CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.14 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3D ΣΤΟ E12 [10] CCID<sub>50</sub>

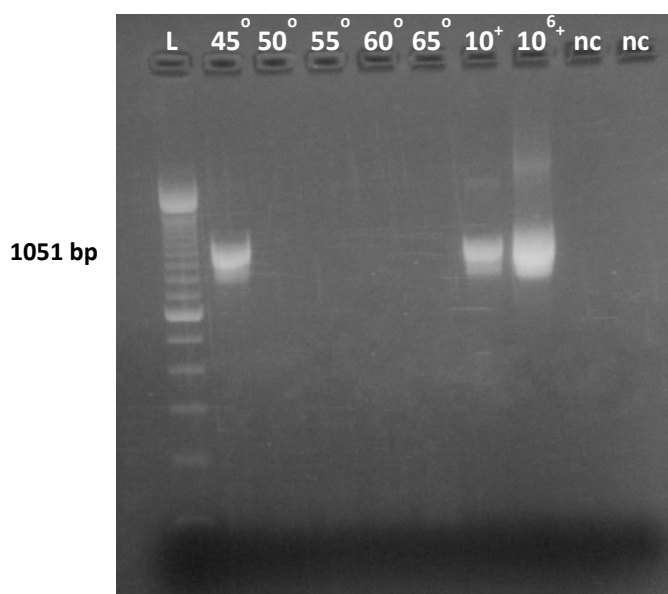
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3D για το πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub> έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μόνο στη θερμοκρασία των 45° C από τις θερμοκρασίες επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν. Στην εικόνα 4.3.14.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Semi Nested-PCR για την ενίσχυση τμήματος της 3C για το στέλεχος Echo 12 [10] CCID<sub>50</sub>, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται μόνο στους 45°C και στους θετικούς μάρτυρες της αντίδρασης. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 582 bp.



**Εικόνα 4.3.14.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested-PCR έπειτα από την ενίσχυση τμήματος της 3D για το στέλεχος Echo 12 10 CCID<sub>50</sub> μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.15 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3'UTR ΣΤΟ SABIN 1 [10] CCID<sub>50</sub>

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3'UTR στοχεύοντας αρχικά την 3D περιοχή για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή παραμένει ακέραια μόνο στη θερμοκρασία των 45°C, ενώ από τους 50°C και πάνω φαίνεται πως υφίσταται βλάβη. Στην εικόνα 4.3.15.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Semi Nested-PCR για το στέλεχος Sabin 1 [10] CCID<sub>50</sub> για τον έλεγχο της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας τμήμα της 3D περιοχής έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται αποκλειστικά στους 45°C. Το προϊόν της αντίδρασης εντοπίζεται στις 1051 bp.

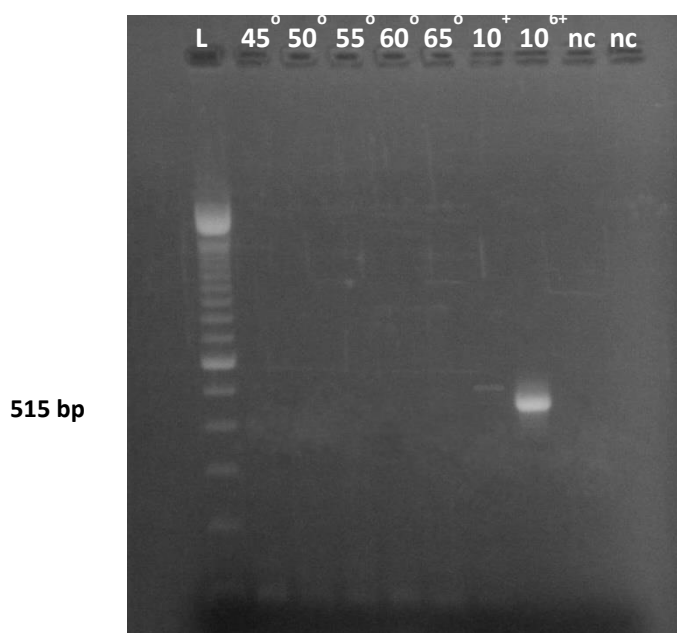


**Εικόνα 4.3.15.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Semi Nested-PCR από τον έλεγχο της ακεραιότητας της 3'UTR στοχεύοντας την 3D για το στέλεχος Sabin 1 10 CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

Όσον αφορά τον έλεγχο της ακεραιότητας της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας την 3C γενωμική περιοχή για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν ανιχνεύεται ακέραια σε καμία από τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς η ειδική ζώνη ανιχνεύεται μόνο στους θετικούς μάρτυρες της αντίδρασης.

#### 4.3.16 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 3'UTR ΣΤΟ E12 [10] CCID<sub>50</sub>

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3'UTR στοχεύοντας αρχικά την 3D περιοχή για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, έδειξαν πως η συγκεκριμένη περιοχή δεν παραμένει ακέραια σε καμία από τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν. Κατά συνέπεια, φαίνεται πως από τους 45°C υφίσταται βλάβη. Ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε από τη διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στην περιοχή 3'UTR στοχεύοντας την 3C περιοχή. Ενδεικτικά στην εικόνα 4.3.16.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Semi Nested-PCR για το στέλεχος E12 [10] CCID<sub>50</sub> για τον έλεγχο της περιοχής 3'UTR στοχεύοντας τμήμα της 3D περιοχής έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C, όπου και φαίνεται πως η ειδική ζώνη ανιχνεύεται αποκλειστικά στους θετικούς μάρτυρες της αντίδρασης και το προϊόν εντοπίζεται στις 515bp.



**Εικόνα 4.3.16.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Semi Nested-PCR από τον έλεγχο της ακεραιότητας της 3'UTR στοχεύοντας την 3D για το στέλεχος E12 10 CCID<sub>50</sub> έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Όπου L: ο μάρτυρας  $\Sigma$  μοριακού βάρους 100bp και nc: οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης ddH<sub>2</sub>O.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της ακεραιότητας των περιοχών 5'UTR, 3C, 3D και 3'UTR τόσο για το στέλεχος Sabin 1 όσο και για το στέλεχος Echo 12 και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Όσον αφορά το στέλεχος S1 φαίνεται πως οι πιο σταθερές περιοχές του γονιδιώματος του έπειτα από θερμική επεξεργασία είναι οι 5'UTR και η 3C, ενώ αντίθετα η πιο ευαίσθητη στη θέρμανση είναι η 3'UTR.

<b>5'UTR</b>	<b>45°C</b>	<b>50°C</b>	<b>55°C</b>	<b>60°C</b>	<b>65°C</b>	<b>70°C</b>	<b>75°C</b>	<b>80°C</b>	<b>82°C</b>
S1 10 <sup>6</sup>			+	+	+	+	+	+	-
S1 10	+	+	+	+	-				
<b>3C</b>	<b>45°C</b>	<b>50°C</b>	<b>55°C</b>	<b>60°C</b>	<b>65°C</b>	<b>70°C</b>	<b>75°C</b>	<b>80°C</b>	<b>82°C</b>
S1 10 <sup>6</sup>			+	+	+	+	+	+	+
S1 10	+	+	+	-	-				
<b>3D</b>	<b>45°C</b>	<b>50°C</b>	<b>55°C</b>	<b>60°C</b>	<b>65°C</b>	<b>70°C</b>	<b>75°C</b>	<b>80°C</b>	<b>82°C</b>
S1 10 <sup>6</sup>			+	+	+	+	+	-	-
S1 10	+	+	+	-	-				
<b>3'UTR</b>	<b>45°C</b>	<b>50°C</b>	<b>55°C</b>	<b>60°C</b>	<b>65°C</b>	<b>70°C</b>	<b>75°C</b>	<b>80°C</b>	<b>82°C</b>
S1 10 <sup>6</sup>			+	+	+	-	-	-	-
S1 10	+	-	-	-	-				

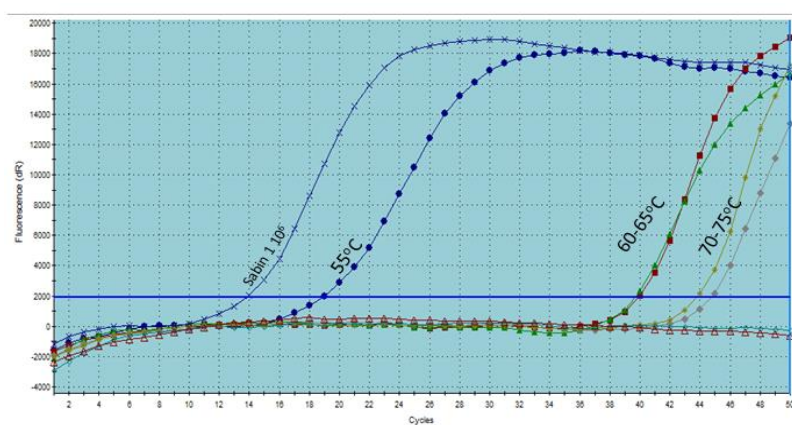


Όσον αφορά το στέλεχος E12 η πιο σταθερή περιοχή του γονιδιώματος έπειτα από θερμική επεξεργασία εντοπίστηκε να είναι η 5'UTR, ενώ η πιο ευαίσθητη εντοπίστηκε και πάλι η 3'UTR, όπως και για το S1.

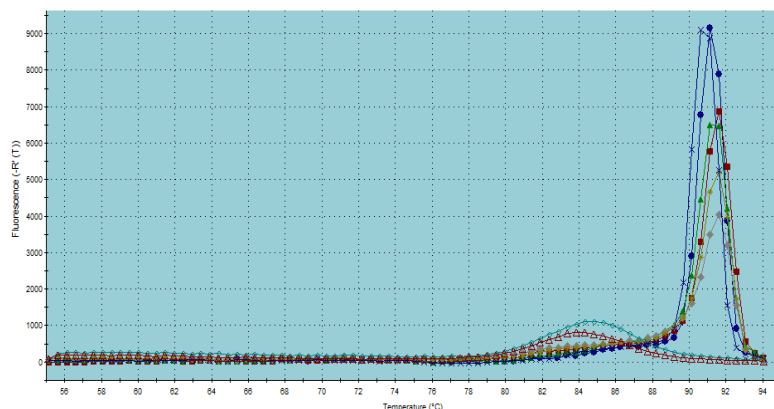
5'UTR	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	82°C
E12 10 <sup>6</sup>			+	+	+	+	+	+	-
E12 10	-	-	-	-	-				
3C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	82°C
E12 10 <sup>6</sup>			+	+	+	+	-	-	-
E12 10	+	-	-	-	-				
3D	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	82°C
E12 10 <sup>6</sup>			+	+	+	+	-	-	-
E12 10	+	-	-	-	-				
3'UTR	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	82°C
E12 10 <sup>6</sup>			+	-	-	-	-	-	-
E12 10	-	-	-	-	-				

#### 4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΑΣ REAL TIME RT-LAMP ΜΕΘΟΔΟΥ

Το στέλεχος Sabin 1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> υποβλήθηκε σε θερμική επεξεργασία στους 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C και 82°C με σκοπό να βρεθεί η κατάλληλη θερμοκρασία για την πλήρη αδρανοποίησή του. Όπως διαπιστώθηκε και από την εφαρμογή της απλής Real Time RT-PCR έπειτα από τρεις ανακαλλιέργειες στα υπό μελέτη δείγματα, πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται από τη θερμοκρασία των 80°C και πάνω. Μία εναλλακτική, γρήγορη και αξιόπιστη μοριακή μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση της αδρανοποίησης και των αποτελεσμάτων της απλής Real Time RT-PCR χρησιμοποιώντας απευθείας το ιικό RNA ως μήτρα, είναι η Real Time RT-LAMP. Η Real Time RT-LAMP αποδείχτηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον έλεγχο της επιτυχίας της αδρανοποίησης, καθώς έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με αυτά της απλής της Real Time RT-PCR όσον αφορά το ιικό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10^6$  CCID<sub>50</sub>.



**Εικόνα 4.4.1:** Amplification Plot του στελέχους S1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 55 έως τους 82°C, όπου φαίνεται πως πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται μεταξύ 80-82°C.

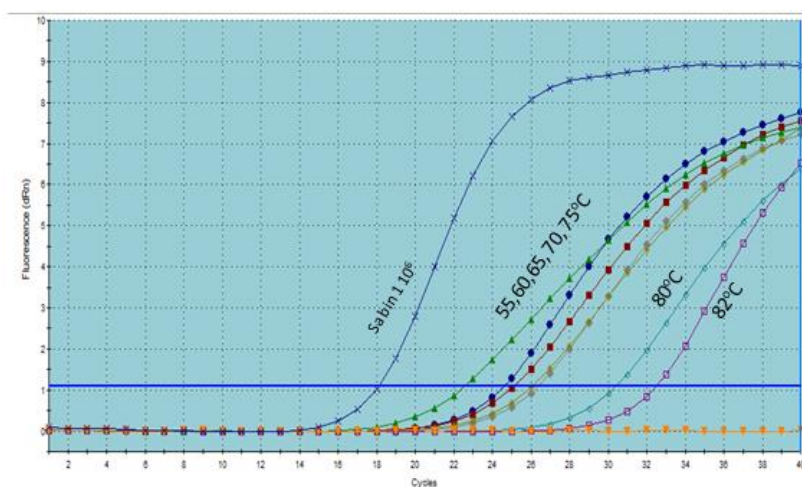


**Εικόνα 4.4.2:** Dissociation Curve του στελέχους S1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> από την 3<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια του ιού σε κύτταρα από τους 55 έως τους 82°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

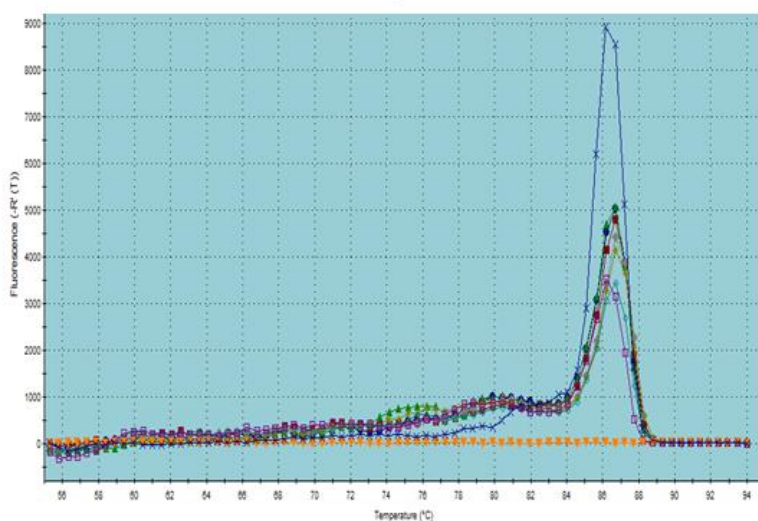
Αντίθετα, όσον αφορά το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, αποδείχτηκε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί λόγω του ορίου ευαισθησίας της, καθώς μετά τη θερμική επεξεργασία ο ιικός τίτλος μειώνεται, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του ιού να ελαττώνεται σημαντικά και να μην ανιχνεύεται. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι για τις συγκεντρώσεις κάτω των 10 CCID<sub>50</sub> η συμβατική Real Time RT-PCR είναι καταλληλότερη για τη μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το στέλεχος Echo 12.

#### 4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΘΡΑΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ 5'UTR

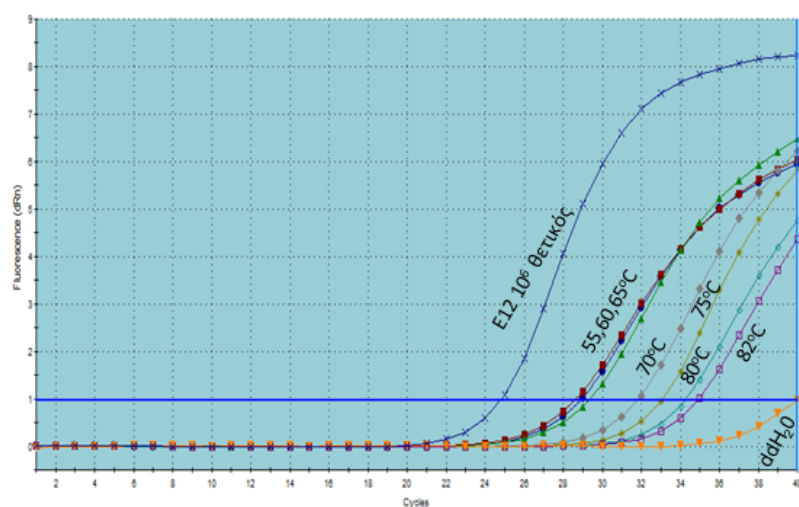
Αρχικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρώτη προσέγγιση που ακολουθήθηκε και αφορά τη χρήση τυχαίων εκκινήτων στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και ακολούθως Real Time PCR με το εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 και για τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, χωρίς τη μεσολάβηση κυτταροκαλλιέργειας.



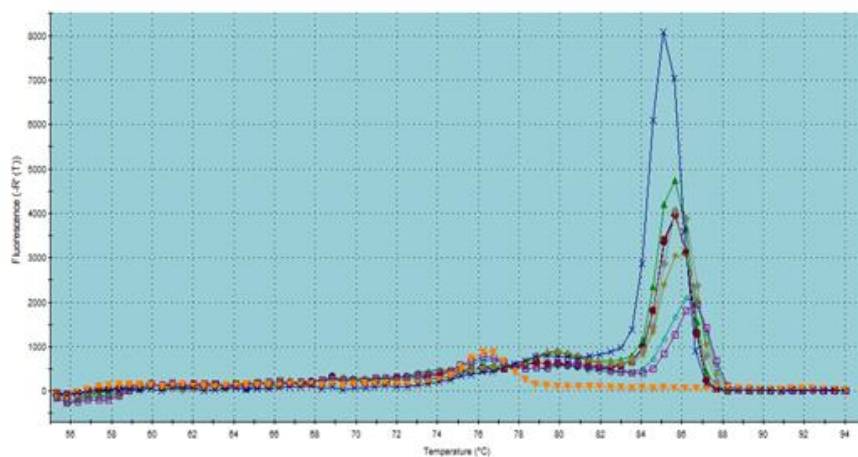
**Εικόνα 4.5.1:** Amplification Plot του στελέχους S1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> για την 5'UTR από τους 55 έως τους 82°C, όπου φαίνεται πως η περιοχή ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες.



**Εικόνα 4.5.2:** Dissociation Curve του στελέχους S1 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> για την 5'UTR από τους 55 έως τους 82°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.



**Εικόνα 4.5.3:** Amplification Plot του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> για την 5'UTR από τους 55 έως τους 82°C, όπου φαίνεται πως η περιοχή ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες.



**Εικόνα 4.5.4:** Dissociation Curve του στελέχους E12 [ $10^6$ ] CCID<sub>50</sub> για την 5'UTR από τους 55 έως τους 82°C, όπου φαίνεται η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διεξαγωγή της απλής PCR, φάνηκε πως η περιοχή 5'UTR δεν ανιχνεύεται στους 82°C και για τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, όπως παρουσιάζεται και στον παρακάτω πίνακα.

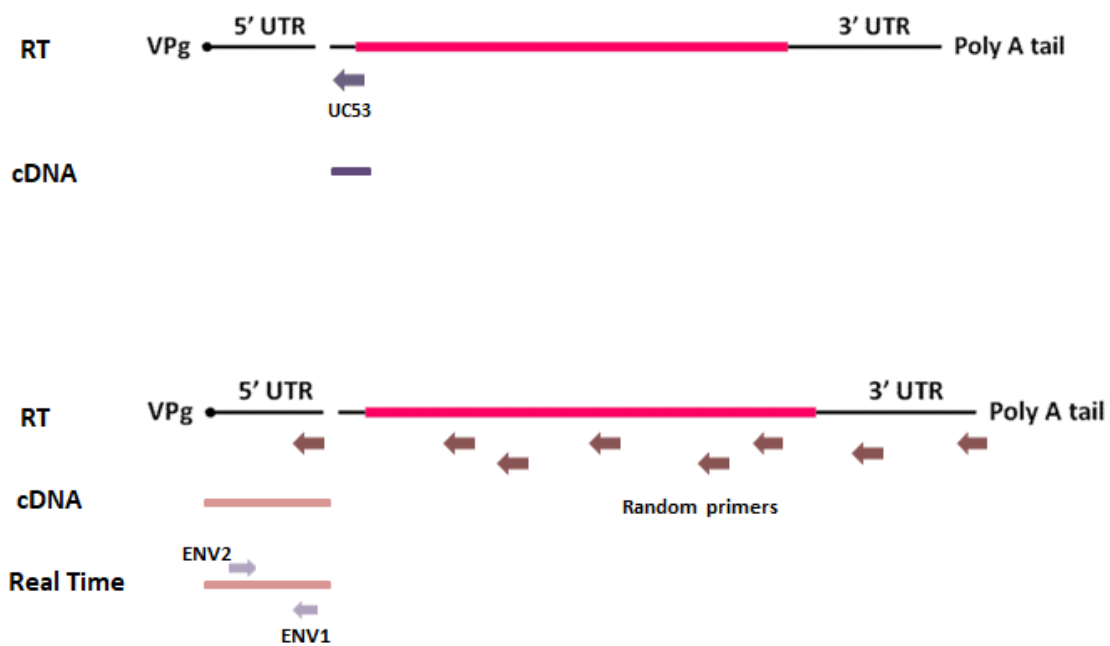
5'UTR	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	82°C
Sabin 1	+	+	+	+	+	+	-
Echo 12	+	+	+	+	+	+	-

**Πίνακας 4.5.1:** Αποτελέσματα PCR για την περιοχή 5'UTR και στα δύο στελέχη στη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub>.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των δύο προσεγγίσεων παρατηρούμε μία διαφορά όσον αφορά τη θερμοκρασία των 82°C. Αυτή η διαφορά σε συνδυασμό με τη διαφορά των εκκινητών ανάμεσα στις δύο προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν, μας βοηθάει να προσδιορίσουμε το σημείο στο οποίο συμβαίνει η θραύση πάνω στη συγκεκριμένη περιοχή και αυτή είναι κοντά στο σημείο που υβριδοποιείται ο antisense εκκινητής UC53 (588-606nt) πάνω στην αλληλουχία της 5'UTR.

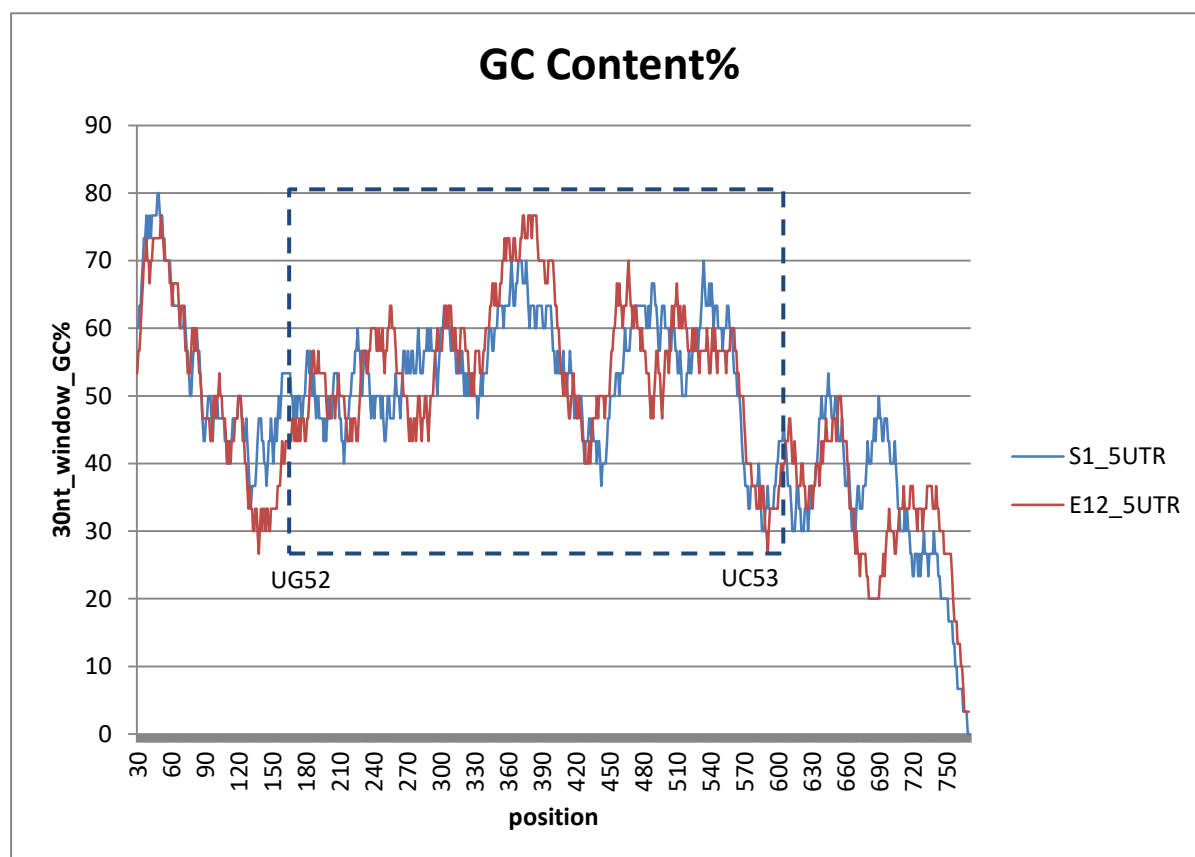
Πιο συγκεκριμένα, όταν κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται ο εκκινητής UC53, εξαιτίας της θραύσης στην περιοχή αυτή δεν μπορεί να προκύψει το συμπληρωματικό cDNA και έτσι κατά την PCR που ακολουθεί δεν υπάρχει θετικό αποτέλεσμα.

Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιούνται random primers στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, η περιοχή της θραύσης παρακάμπτεται και προκύπτει το συμπληρωματικό cDNA το οποίο ξεκινάει εσωτερικά του σημείου θραύσης και παράλληλα υβριδισμού του UC53. Έτσι, στη Real Time που ακολουθεί με το εσωτερικό εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 προκύπτει θετικό αποτέλεσμα για την περιοχή αυτή σε όλες τις θερμοκρασίες. Η εξήγηση παρουσιάζεται και παραστατικά στο σχήμα που ακολουθεί.



**Εικόνα 4.5.5:** Σχηματική αναπαράσταση του προσδιορισμού της ρήξης στη συντηρημένη περιοχή 5'UTR.

#### 4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GC ΤΩΝ 2 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ 5'UTR και 3'UTR

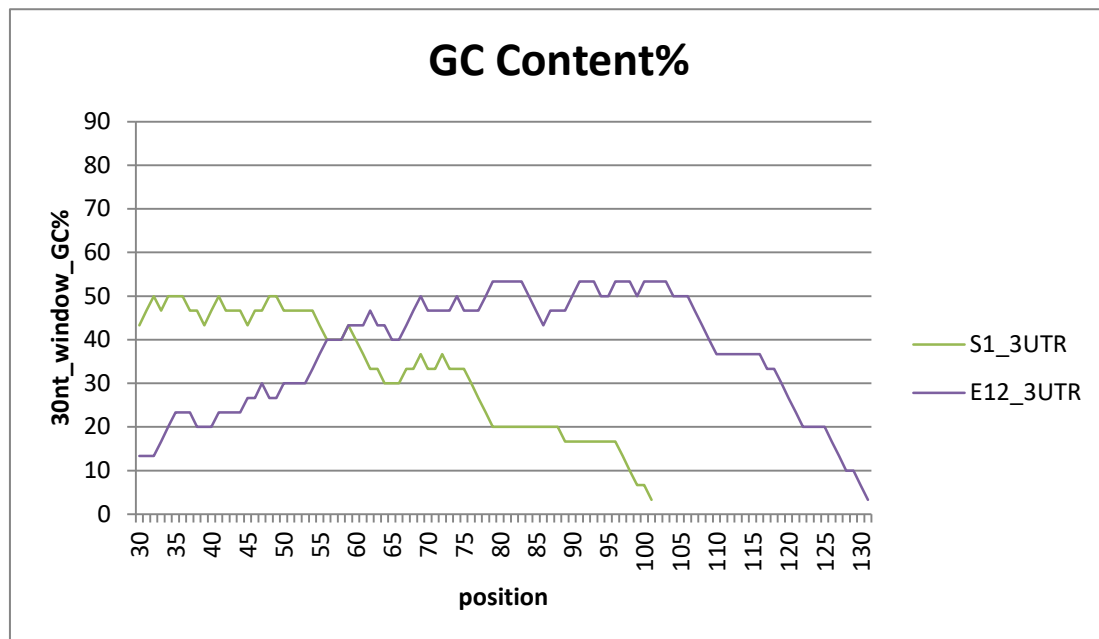


**Εικόνα 4.6.1:** Διάγραμμα περιεκτικότητας GC των στελεχών S1 και E12 στην περιοχή 5'UTR.

Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε GC της περιοχής 5'UTR στα στελέχη Sabin 1 και Echo 12. Με το διακεκομμένο κουτί ορίζεται η περιοχή της 5'UTR που ελέγχεται για ρήξη. Όπως παρατηρούμε από το διάγραμμα, στη θέση 589 η περιεκτικότητα σε GC είναι η χαμηλότερη μέσα στην περιοχή ελέγχου. Πειραματικά, είχαμε προσδιορίσει ότι η ρήξη στην 5'UTR προκαλείται κοντά στην περιοχή πρόσδεσης του εκκινητή UC53 (588-606nt). Συνεπώς, τα πειραματικά αποτελέσματα επαληθεύονται όσον αφορά τη θέση δημιουργίας ρήξης πάνω στην περιοχή 5'UTR.



Η 3'UTR ελέγχθηκε σε όλο της το μήκος. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα όσον αφορά την περιεκτικότητα GC μεταξύ των δύο περιοχών παρατηρούμε πως η 5'UTR εμφανίζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα, δίνοντας έτσι μία ένδειξη για τη σταθερότητα των δύο περιοχών. Πειραματικά φάνηκε πως η 5'UTR είναι η πιο σταθερή περιοχή του γονιδιώματος, σε αντίθεση με την 3'UTR που εντοπίστηκε ως η πιο ευάλωτη στη θέρμανση.



**Εικόνα 4.6.2:** Διάγραμμα περιεκτικότητας GC των στελεχών S1 και E12 στην περιοχή 3'UTR.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Εντεροϊοί είναι μικροί μη ελυτροφόροι ιοί της οικογένειας *Picornaviridae* του γένους *Enterovirus*. Το γονιδίωμά τους απαρτίζεται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μήκους 7.500bp το οποίο προστατεύεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας (Pallansch, 2013). Βρίσκονται ανάμεσα στους πιο κοινούς ιούς που μολύνουν τον άνθρωπο παγκοσμίως (Khetsuriani, Lamonte-Fowlkes, Oberst, & Pallansch, 2006) και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων το οποίο περιλαμβάνει ασυμπτωματικές μολύνσεις, αλλά και πολύ σοβαρές ασθένειες, όπως για παράδειγμα η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η παραλυτική πολιομυελίτιδα (Pallansch, 2013).

Οι Εντεροϊοί μεταδίδονται κυρίως μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού (Rajtar, Majek, Polański, & Polz-Dacewicz, 2008) και η μόλυνση από αυτούς τους ιούς συμβαίνει κυρίως είτε σε περιόδους τροπικών βροχοπτώσεων, είτε κατά τους θερινούς και φθινοπωρινούς μήνες όπου το κλίμα που επικρατεί είναι εύκρατο, επηρεάζοντας κυρίως τα παιδιά (Kargar, Sadeghipour, & Nategh, 2009). Η πιθανότητα μόλυνσης από Εντεροϊούς σχετίζεται άμεσα με συνθήκες κακής υγιεινής, αλλά και συνωστισμού μη επαρκώς εμβολιασμένων πληθυσμών (Kargar et al., 2009).

Ένας μεγάλος αριθμός Εντεροϊών έχει ανιχνευθεί τόσο σε περιβαλλοντικά (Zaharoula Kyriakopoulou et al., 2010) και κλινικά δείγματα (Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006), καθώς και σε διάφορα τρόφιμα (Iritani et al., 2014; Kopecka, Dubrou, Prevot, Marechal, & López-Pila, 1993; Nicholson, Meetoo, Aiyar, Banatvala, & Muir, 1994). Ένα πολύ συχνό φαινόμενο μόλυνσης από Εντεροϊούς είναι η επαφή με νερό, φαγητό και χώμα που έχουν προηγουμένως εκτεθεί σε μολυσμένα κόπρανα (Bolanaki et al., 2008; P. Vasickova, 2005; Rajtar et al., 2008), καθώς οι Εντεροϊοί βρίσκονται ως επί το πλείστον στα απόβλητα (Dedepsidis et al., 2007; Z. Kyriakopoulou et al., 2010; Kyriakopoulou et al., 2011). Όσον αφορά τα τρόφιμα, Εντεροϊοί έχουν ανιχνευθεί σε φρέσκο γάλα και γιαούρτι, ωμά πράσινα λαχανικά και μη μαγειρεμένα οστρακοειδή (N. Casas & Suñén, 2001; P. Vasickova, 2005).

Οι πρώτοι Εντεροϊοί που φάνηκε να σχετίζονται με κατανάλωση ποτού-φαγητού, ήταν οι Πολιοϊοί (PVs). Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη καταγεγραμμένη έξαρση από Εντεροϊούς και συγκεκριμένα από το στέλεχος Πολιοϊού τύπου 1 (PV1), σχετιζόμενη με κατανάλωση φαγητού, ήταν το 1914 μέσω κατανάλωσης φρέσκου μη παστεριωμένου γάλακτος (Jubb, 1915). Επιπλέον, στη μελέτη των Ward και Irving ωμά λαχανικά ψεκάστηκαν με νερό προερχόμενο από λύματα και στη συνέχεια ελέγχθηκαν για ύπαρξη

Εντεροϊών. Φάνηκε πως μετά την έκθεση των λαχανικών στο νερό που προερχόταν από απόβλητα, ο PV1 μπορούσε να ανιχνευθεί σε σέλερι, σπανάκι, μαρούλι και τομάτα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Ward & Irving, 1987). Επιπρόσθετα, έχουν προκύψει εξάρσεις που συνδέονται με τρόφιμα και από άλλους Εντεροϊούς όπως ιούς Coxsackie και Echo (Cliver, 1997; SA Sattar, 2001).

Για το λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαία η συνεχής παρακολούθηση περιβαλλοντικών, κλινικών και προερχόμενων από τρόφιμα και υγρά δειγμάτων για τυχόν ύπαρξη διαφόρων στελεχών Εντεροϊών, καθώς επίσης και η απόκτηση πληροφοριών για πιθανούς τρόπους αδρανοποίησής τους. Οι Εντεροϊοί μπορούν να παραμένουν για μεγάλο διάστημα στο περιβάλλον, καθώς είναι ιδιαίτερα σταθεροί κάτω από όξινες συνθήκες pH 3-5. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως μπορούν να είναι ανθεκτικοί και στα γαστρικά υγρά (Kurdziel, Wilkinson, Langton, & Cook, 2001). Επιπλέον, δεν έχουν έλυτρο ώστε να τους καταστήσει ευαίσθητους σε ορισμένους χημικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα σε αλκοόλες και επίσης έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να ανιχνεύονται στο πόσιμο νερό ακόμα και μετά τη διαδικασία απολύμανσής του (Jin et al., 2013).

Γι' αυτό το λόγο στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση των Εντεροϊών και πιο ειδικά των στελεχών Sabin 1 και Echo 12. Το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 ανήκει στους Εντεροϊούς της ομάδας C, ενώ αντίστοιχα το πρότυπο στέλεχος Echo 12 ανήκει στους Εντεροϊούς της ομάδας B. Η επιλογή δύο διαφορετικών ιικών στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες του ίδιου γένους έγινε με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και τον εντοπισμό ομοιοτήτων αλλά και διαφορών όσον αφορά την αδρανοποίησή τους μέσω θέρμανσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις από το κάθε στέλεχος, μία αρκετά υψηλή της τάξης των  $10^6$  CCID<sub>50</sub> και μία αρκετά χαμηλή της τάξης των 10 CCID<sub>50</sub>. Η υψηλή συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε ως μία πιο ακραία συνθήκη όσον αφορά τον αριθμό των ιοσωματίων και η χαμηλότερη έτσι ώστε να προσεγγίσουμε με πιο ρεαλιστικό τρόπο τη συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον. Ανάλογα με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες αδρανοποίησης καθώς για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση απαιτείται υψηλότερη θερμοκρασία για την επίτευξη πλήρους αδρανοποίησης. Αυτό συμβαίνει καθώς τα ιοσωμάτια των Εντεροϊών όταν βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα, με αποτέλεσμα το ιοσωμάτιο που βρίσκεται στο κέντρο του συσσωματώματος να προστατεύεται και να διαφεύγει της αδρανοποίησης.

Έτσι, και για τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 78°C, 80°C

και 82°C για 30 λεπτά με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή. Αντίστοιχα, για τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 10 CCID<sub>50</sub> οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 45°C, 50°C, 55°C, 58°C, 60°C, 65°C και 70°C για 30 λεπτά με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή. Μετά τη θερμική επεξεργασία τα στελέχη ενοφθαλμίστηκαν σε κύτταρα Rd για τρεις συνεχόμενες ανακαλλιέργειες έτσι ώστε να προσδιοριστεί με ασφάλεια η κατάλληλη θερμοκρασία αδρανοποίησής τους. Μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια, τα θερμικά επεξεργασμένα στελέχη υποβλήθηκαν σε αντίστροφη μεταγραφή, καθώς το γονιδίωμα των Εντεροϊών είναι μονόκλωνο RNA, με τη χρήση τυχαίων εκκινητών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR με το universal εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 που στοχεύει στην πλέον συντηρημένη περιοχή των Εντεροϊών 5'UTR και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευσή τους. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν προσδιορίστηκε πως η κατάλληλη θερμοκρασία αδρανοποίησης που απαιτείται και για τα δύο στελέχη στην υψηλή συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 80-82°C, ενώ για τη χαμηλότερη συγκέντρωση εντοπίσαμε μία διαφορά όσον αφορά τη θερμοκρασία αδρανοποίησης των δύο στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν. Πιο αναλυτικά, η κατάλληλη θερμοκρασία αδρανοποίησης για το στέλεχος Sabin 1 10 CCID<sub>50</sub> βρέθηκε να είναι στους 60°C, ενώ για το στέλεχος Echo 12 ίδιας συγκέντρωσης βρέθηκε να είναι στους 55°C. Παρόμοια μελέτη στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί ξηρή θέρμανση ωστόσο, ως τρόπος αδρανοποίησης των Εντεροϊών, είχε δείξει μεγάλη απόκλιση μεταξύ των δύο στελεχών PV1 και Coxsackievirus B3 (CVB3) που είχαν χρησιμοποιηθεί και ανήκουν στις ομάδες Εντεροϊών C και B αντίστοιχα (Sauerbrei & Wutzler, 2009). Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη είχε αποδειχτεί ότι για την αδρανοποίηση του στελέχους PV1 απαιτείται ξηρή θέρμανση σε θερμοκρασία μεγαλύτερη ή ίση των 75°C για 1 ώρα, ενώ αντίθετα για το στέλεχος CVB3 η απαιτούμενη θερμοκρασία ήταν χαμηλότερη (Sauerbrei & Wutzler, 2009).

Όπως γνωρίζουμε όμως, η ανίχνευση απλώς του γονιδιώματος των Εντεροϊών δεν αντανakλά αυτόματα και την ενεργότητά τους και συνεπώς την ικανότητά τους να μολύνουν κύτταρα. Γι' αυτό είναι αναγκαίος ο έλεγχος και της αντιγραφικής τους ενεργότητας, εκτός από την ανίχνευση του γονιδιώματός τους. Στον κύκλο ζωής των Εντεροϊών, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, απαραίτητο βήμα είναι η μετατροπή του θετικής πολικότητας RNA τους στο συμπληρωματικό RNA αρνητικής πολικότητας, το οποίο είναι αυτό που στη συνέχεια χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων θετικής πολικότητας. Κατά συνέπεια λοιπόν, αυτό που τους καθιστά αντιγραφικά ενεργούς και επομένως ικανούς να μολύνουν τα κύτταρα ξενιστές είναι η ύπαρξη του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Fikatas et al., 2017; Li et al., 2002).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναπτύχθηκε μία ειδική Stem-Loop Reverse Transcription Real-Time PCR, η οποία επέτρεψε την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) των στελεχών Sabin 1 και Echo 12 που χρησιμοποιήθηκαν. Μέσω της ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, δημιουργήθηκαν 4 κινητικές μελέτες για την αντιγραφική δραστηριότητα των δύο στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε 2 συγκεντρώσεις, μία αρκετά υψηλή της τάξης των  $10^6$  CCID<sub>50</sub> και μία αρκετά χαμηλή της τάξης των 10 CCID<sub>50</sub>. Στόχος ήταν να εντοπίσουμε το χρόνο έναρξης, αλλά και την πορεία της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξενιστές, ώστε να τα χρησιμοποιήσουμε σε περαιτέρω μελέτες. Παράλληλα δημιουργήθηκαν και 4 κινητικές μελέτες για την ανίχνευση του θετικού κλώνου μέσα στα κύτταρα σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, με σκοπό να εντοπιστούν οι διαφορές με τον αρνητικό κλώνο.

Η τεχνική που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, χάρη στη χαρακτηριστική δομή του εκκινητή που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της RT και συμβάλλει στη θερμοδυναμική του σταθερότητα, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ παράλληλα δεν είναι καθόλου χρονοβόρα σε σύγκριση με τις κυτταροκαλλιέργειες. Επιπρόσθετα, ο σχεδιασμός του ειδικού stem-loop εκκινητή της RT έχει γίνει στοχεύοντας τμήμα της 5'UTR των Εντεροϊών, που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι η πιο συντηρημένη περιοχή ανάμεσα σε αυτό το γένος ιών. Έτσι, μέσω αυτής της μοριακής τεχνικής, είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών.

Πιο συγκεκριμένα, ο ειδικός stem-loop εκκινητής της RT (EntNS4-RT) που στοχεύει τον αντιγραφόμενο κλώνο, φέρει τρεις διακριτές περιοχές. Μία ειδική ιική αλληλουχία στο 3' άκρο που στοχεύει την 5'UTR του αρνητικού κλώνου, μία stem-loop δομή κοντά στο 5' άκρο και μια χαρακτηριστική μη-ιική αλληλουχία στη θηλιά του 5' άκρου. Επιπλέον, στη διαδικασία της Real-Time PCR που ακολουθεί, ο ένας εκ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιούνται (EntNS2F) διαθέτει την ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία με την αλληλουχία θηλιάς του 5' άκρου του stem-loop εκκινητή που χρησιμοποιείται στην αντίστροφη μεταγραφή. Ο σχεδιασμός αυτός επιτρέπει τον υβριδισμό του πάνω στην αλληλουχία του εκκινητή της RT και όχι στο γονιδίωμα του ιού, καθιστώντας τη διαδικασία εξαιρετικά ειδική.

Για την ανίχνευση του θετικού κλώνου, η διαδικασία ήταν αρκετά απλή σχετικά με αυτή για τον αρνητικό κλώνο. Πιο αναλυτικά, μετά την απομόνωση των δειγμάτων σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ακολούθησε εκχύλιση του

γενετικού υλικού, αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίους εκκινητές και Real-Time PCR με το universal εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 που στοχεύει στην πλέον συντηρημένη περιοχή των Εντεροϊών 5'UTR και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευσή τους. Με την προσέγγιση αυτή υπάρχει πιθανότητα να ανιχνεύεται παράλληλα και ο αρνητικός πολικότητας κλώνος, όμως το βασικό προϊόν ανίχνευσης αποτελεί ο θετικός κλώνος, ο οποίος βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με τον αρνητικής.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχτηκε ότι και τα δύο στελέχη εμφάνισαν παρόμοιο πρότυπο ανίχνευσης για τον αρνητικό κλώνο και για τις δύο συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, για τη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> και για τα δύο στελέχη, ο αρνητικός κλώνος εντοπίστηκε 4 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ αντίστοιχα για τη χαμηλότερη συγκέντρωση ο αρνητικός κλώνος ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως ένα αντιγραφικά ενεργό στέλεχος S1 ή E12 σε συγκέντρωση  $10^6$  μπορεί να ανιχνευθεί σε 4 ώρες από τη στιγμή μόλυνσης της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ σε συγκέντρωση 10 μέσα σε 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τα αποτελέσματα αυτά συγκριτικά με αυτά που προέκυψαν από την παρατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης, αποδεικνύουν την ικανότητα της Stem-Loop Reverse Transcription Real-Time PCR μεθόδου που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή να εντοπίζει την αντιγραφική ενεργότητα των Εντεροϊών σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από ότι η κυτταροκαλλιέργεια.

Όσον αφορά το θετικό κλώνο, αυτός ανιχνεύθηκε και για τα δύο στελέχη στην υψηλή συγκέντρωση 2 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ για τη χαμηλότερη συγκέντρωση των στελεχών S1 και E12 εντοπίζεται 2 και 4 ώρες αντίστοιχα. Αυτή η διαφορά ανάμεσα στους δύο κλώνους προκύπτει κυρίως από το γεγονός ότι θετικός κλώνος βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (30-50 φορές) από ότι ο αρνητικός μέσα στα κύτταρα (Novak & Kirkegaard, 1991).

Επιπλέον, οι κινητικές μελέτες που αναπτύχθηκαν για τη χαμηλότερη συγκέντρωση εφαρμόστηκαν σε 15 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) τα οποία είχαν χαρακτηριστεί θετικά για την ύπαρξη Εντεροϊού. Αυτή η επιλογή έγινε καθώς στο ENY οι Εντεροϊοί βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις. Μετά την εφαρμογή, αποδείχτηκε πως σε μόνο 5 από το σύνολο των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν αντιγραφικά ενεργοί Εντεροϊοί, ενώ σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε το γονιδίωμα τους. Τα στελέχη τα οποία βρέθηκαν θετικά και για τους δύο κλώνους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν στην VP1 γενωμική περιοχή, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση των Εντεροϊών (Dimitriou et al., 2014; Kottaridi, Bolanaki, & Markoulatos, 2004; Kyriakopoulou et al., 2013). Τα

αποτελέσματα έδειξαν πως 3/5 ταυτοποιήθηκαν ως Echovirus 30, 1/5 ταυτοποιήθηκε ως Coxsackievirus B3 και 1/5 ως Coxsackievirus B5, αποδεικνύοντας την υπόθεση πως μέσω της παρούσας μοριακής τεχνικής που αναπτύχθηκε, είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών, αφού ο σχεδιασμός του ειδικού stem-loop εκκινητή της RT έχει γίνει στοχεύοντας τμήμα της 5'UTR των Εντεροϊών.

Οι συγκεκριμένες κινητικές μελέτες που μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως επιβεβαιωτική μέθοδος για την εξακρίβωση της επιτυχούς αδρανοποίησης διαφόρων στελεχών των Εντεροϊών, κερδίζοντας αρκετό χρόνο συγκριτικά με τις κυτταροκαλλιέργειες. Ακόμη, βρίσκουν εφαρμογή σε στελέχη Εντεροϊών τα οποία δεν προκαλούν κυτταροπαθογόνες αλλοιώσεις σε υπάρχουσες κυτταρικές σειρές, όπως για παράδειγμα ορισμένα στελέχη Coxsackie A.

Επόμενο κομμάτι της διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στους Εντεροϊούς. Η υπόθεση είναι ότι η θέρμανση επηρεάζει είτε τη δομή του καψιδίου τους, είτε το γονιδίωμα τους προκαλώντας θραύσεις, είτε και τα δύο. Στην παρούσα διατριβή αποφασίσαμε να ελέγξουμε την ύπαρξη θραύσεων στο ιικό γονιδίωμα μετά τη θερμική επεξεργασία, ελέγχοντας τις πιο ευαίσθητες περιοχές του γονιδιώματος για πρόκληση θραύσεων σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αυτές οι περιοχές είναι οι 5'UTR, 3C, 3D και 3'UTR (Jin et al., 2012; Simonet & Gantzer, 2006). Όσον αφορά τις βλάβες που προκύπτουν στο γονιδίωμα των Εντεροϊών μέσω θέρμανσης πολύ λίγα στοιχεία είναι γνωστά, ενώ το καψίδιο έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το καψίδιο, προηγούμενη μελέτη είχε δείξει ότι μετά από θερμική αδρανοποίηση και παρατήρηση μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας τα καψίδια των Πολιοϊών ήταν άδεια (Shiomi et al., 2004).

Ο έλεγχος της ακεραιότητας του γονιδιώματος των δύο στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά τη θερμική τους επεξεργασία στις θερμοκρασίες 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 82°C για τη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> και στις θερμοκρασίες 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C για τη συγκέντρωση 10 CCID<sub>50</sub>, για 30 λεπτά με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή. Οι θερμοκρασίες αυτές επιλέχθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας αδρανοποίησης. Τα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα υποβλήθηκαν απευθείας σε εκχύλιση του ιικού RNA και έπειτα σε αντίστροφη μεταγραφή με τον ειδικό antisense εκκινητή για κάθε περιοχή που ελέγχθηκε, χωρίς τη μεσολάβηση κυτταροκαλλιέργειας. Αυτό έγινε επειδή σε αυτό το στάδιο της διατριβής μας ενδιέφερε να ελέγξουμε την

ακεραιότητα του γονιδιώματος εξετάζοντας τις πιο ευαίσθητες περιοχές για πρόκληση ρήξεων καθώς αν χρησιμοποιούσαμε κυτταροκαλλιέργειες, στις θερμοκρασίες που δεν υπήρχε πλήρης αδρανοποίηση τα ιικά σωματίδια που είχαν παραμείνει ενεργά, μετά τη μόλυνση της καλλιέργειας, θα πολλαπλασιάζονταν και δε θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε αυτά στα οποία θα είχε προκληθεί η ρήξη. Στη συνέχεια, μετά το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούσε PCR ή Nested-PCR, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για κάθε περιοχή και κάθε στέλεχος που ελέγχθηκε. Η λογική πίσω από αυτή τη μεθοδολογία ήταν πως αν στην περιοχή που ελεγχόταν υπήρχε ρήξη, τότε δε θα μπορούσε να παραχθεί το cDNA κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και επομένως στην αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης που ακολουθούσε δεν θα προέκυπτε θετικό αποτέλεσμα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για το στέλεχος Sabin 1 οι πιο σταθερές περιοχές του γονιδιώματος ήταν η 5'UTR και η 3C, ενώ αντιθέτως η πιο ευαίσθητη περιοχή σε θερμική επεξεργασία εντοπίστηκε να είναι η 3'UTR. Αντίστοιχα για το στέλεχος E12 η πιο σταθερή περιοχή αποδείχτηκε η 5'UTR, ενώ και πάλι η πιο ευαίσθητη ήταν η 3'UTR. Επίσης, το στέλεχος E12 έδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία στη θέρμανση συγκριτικά με το στέλεχος S1, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα εύρεσης της κατάλληλης θερμοκρασίας αδρανοποίησης. Τα αποτελέσματα μας τόσο για την αυξημένη ευαισθησία της περιοχής 3'UTR, όσο και για τη σταθερότητα της 3C έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που εξέτασε την αποικοδόμηση του γονιδιώματος του στελέχους PV1 έπειτα από επεξεργασία με διοξείδιο του χλωρίου, αν και η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν εντελώς διαφορετική από τη δική μας (Simonet & Gantzer, 2006). Αντίθετα, έρχονται σε διαφωνία με προϋπάρχουσες μελέτες όσον αφορά τα αποτελέσματα για την 5'UTR, καθώς εμείς αποδεικνύουμε την αυξημένη ανθεκτικότητά της, ενώ εκείνες καταλήγουν στο αντίθετο συμπέρασμα (Jin et al., 2013; Jin et al., 2012; Simonet & Gantzer, 2006). Ωστόσο, η διαφορά με αυτές τις μελέτες είναι πως σε όλες ο τρόπος αδρανοποίησης είναι χημικός και συγκεκριμένα μέσω διοξειδίου του χλωρίου, ενώ αντίθετα στην παρούσα διδακτορική διατριβή ο τρόπος αδρανοποίησης είναι μέσω θέρμανσης. Το γεγονός αυτό, αποτελεί μία ένδειξη για ανθεκτικότητα της συντηρημένης περιοχής 5'UTR στη θερμική επεξεργασία, συγκριτικά με την ευαισθησία που παρουσιάζει στη χημική.

Για το λόγο αυτό, η 5'UTR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν στόχος μέσω μοριακών τεχνικών για τη διερεύνηση της αδρανοποίησής των Εντεροϊών, καθώς είναι η περιοχή που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευσή τους (Jin et al., 2012; Siafakas, Markoulatos, & Stanway, 2002; Siafakas, Markoulatos, Stanway, Tzanakaki, & Kourea-Kremastinou, 2002; Siafakas et al., 2005)



Επόμενος στόχος της διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας ευαίσθητης, ειδικής και σύγχρονης ισοθερμικής μοριακής τεχνικής ανίχνευσης των Εντεροϊών (Real Time RT-LAMP) ως εναλλακτικός τρόπος επιβεβαίωσης της θερμικής αδρανοποίησης τους στοχεύοντας την 5'UTR. Έτσι, αναπτύχθηκε μία Real Time RT-LAMP, ώστε να παρέχει σε ένα στάδιο, κάτω από ισοθερμικές συνθήκες την ενίσχυση RNA στόχου. Σε αυτή τη μέθοδο σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 6 εκκινητές σχεδιασμένοι να στοχεύουν την 5'UTR των Εντεροϊών. Στο μίγμα της αντίδρασης εμπεριέχεται η ειδική DNA πολυμεράση με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου Bst 2.0 που χρησιμοποιείται στην αντίδραση της LAMP και η αντίστροφη μεταγραφάση WarmStart RTx στο κατάλληλο buffer, τροποποιημένες ώστε να έχουν βελτιωμένη απόδοση. Περιέχεται επίσης και μία φθορίζουσα χρωστική, ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ποικίλα δίκλωνα μόρια που παράγονται από την αντίδραση και φθορίζουν κάτω από συγκεκριμένο μήκος κύματος, αντίστοιχο με αυτό της SYBR Green.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχτηκε ότι η Real Time RT-LAMP που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον έλεγχο της επιτυχίας της αδρανοποίησης όσον αφορά το ιικό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10^6$  CCID<sub>50</sub>, καθώς έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με αυτά της απλής της Real Time RT-PCR. Αντίθετα, όσον αφορά το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 CCID<sub>50</sub>, αποδείχτηκε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί λόγω του ορίου ευαισθησίας της, καθώς με τη θέρμανση ο ιικός τίτλος μειώνεται σημαντικά. Ως αποτέλεσμα στην περίπτωση της χαμηλής αρχικής συγκέντρωσης που χρησιμοποιείται (10 CCID<sub>50</sub>), μετά τη θερμική επεξεργασία η συγκέντρωση του ιού ελαττώνεται ακόμα περισσότερο και πέφτει κάτω από 10 CCID<sub>50</sub>, έχοντας ως συνέπεια την αδυναμία της συγκεκριμένης μεθόδου να τα ανιχνεύσει. Έτσι, συμπεραίνεται πως για τις συγκεντρώσεις κάτω των 10 CCID<sub>50</sub> η συμβατική Real Time RT-PCR είναι καταλληλότερη για τη μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης.

Στο τελευταίο στάδιο της διατριβής, λόγω της σημασίας της περιοχής 5'UTR για την ανίχνευση των Εντεροϊών, έγινε πιο εκτεταμένη μελέτη όσον αφορά το σημείο πρόκλησης θραύσης μετά από θέρμανση στη θερμοκρασία των 82°C, που προσδιορίστηκε ως κατάλληλη για την πλήρη αδρανοποίηση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πιο αναλυτικά, για τον έλεγχο της περιοχής αυτής εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν. Στην πρώτη προσέγγιση, κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ο universal

εκκινητής UC53. Εξαιτίας της ύπαρξης θραύσης στην περιοχή αυτή όμως, δεν ήταν δυνατό να προκύψει το συμπληρωματικό cDNA και έτσι κατά την PCR που ακολούθησε δεν προέκυψε θετικό αποτέλεσμα. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιήθηκαν random primers στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, η περιοχή της θραύσης παρακάμφθηκε και έτσι μπόρεσε να δημιουργηθεί το συμπληρωματικό cDNA, το οποίο ξεκινάει εσωτερικά του σημείου θραύσης και παράλληλα υβριδισμού του UC53. Έτσι, στη Real Time PCR που ακολούθησε με το εσωτερικό εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1, προέκυψε θετικό αποτέλεσμα για την περιοχή αυτή σε όλες τις θερμοκρασίες επεξεργασίας.

Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκε πως το σημείο στο οποίο συμβαίνει η θραύση στη συγκεκριμένη περιοχή είναι κοντά στο σημείο που υβριδοποιείται ο antisense εκκινητής UC53 (588-606nt) πάνω στην αλληλουχία της 5'UTR. Τα αποτελέσματα αυτά, όσο και τα αποτελέσματα προσδιορισμού της πιο σταθερής (5'UTR), αλλά και της πιο ευαίσθητης (3'UTR) περιοχής ενισχύθηκαν και μέσω υπολογισμού της περιεκτικότητας GC των περιοχών αυτών, η οποία αποτελεί ένδειξη της σταθερότητας μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τη θέση ρήξης στην 5'UTR παρατηρήσαμε ότι στη θέση 589 η περιεκτικότητα σε GC είναι η χαμηλότερη μέσα στην περιοχή ελέγχου, επαληθεύοντας έτσι τα πειραματικά αποτελέσματα για τη θέση της ρήξης, η οποία είχε προσδιοριστεί κοντά στην περιοχή πρόσδεσης του εκκινητή UC53 (588-606nt). Συνεπώς, τα πειραματικά αποτελέσματα επαληθεύονται όσον αφορά τη θέση δημιουργίας ρήξης πάνω στην περιοχή 5'UTR.

Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή διαπιστώνουμε πως η θερμική επεξεργασία μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματικό τρόπο αδρανοποίησης των Εντεροϊών, και ιδιαίτερα σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, προσδιορίστηκε ότι η θέρμανση επηρεάζει την ακεραιότητα του γονιδιώματος των Εντεροϊών, καθώς οδηγεί στη δημιουργία ρήξεων σε πολλές περιοχές του, με την 3'UTR να ανιχνεύεται ως η πλέον ευαίσθητη περιοχή στη θέρμανση. Αποδείχθηκε επίσης, ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της ιικής μολυσματικότητας και για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θερμικής αδρανοποίησης είναι απαραίτητος ένας πλήρης έλεγχος ο οποίος περιλαμβάνει 2-3 ανακαλλιέργειες του ιού σε ευαίσθητη κυτταρική σειρά σε συνδυασμό με την ανίχνευση ρήξεων τουλάχιστον στην 3'UTR και στην 5'UTR, και τέλος την ανίχνευση του θετικού αλλά κυρίως του αρνητικού κλώνου των Εντεροϊών στην 5'UTR γενωμική περιοχή, καθώς η ανίχνευση του θετικού κλώνου του RNA του γονιδιώματος των Εντεροϊών δεν αποτελεί ένδειξη ενός ενεργά αντιγραφικού ιού και κατά συνέπεια μολυσματικού ιού.

Η μεθοδολογική προσέγγιση η οποία αναπτύχθηκε στη παρούσα διατριβή μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί στη παραγωγή των αδρανοποιημένων εμβολίων (μέσω θερμικής ή χημικής αδρανοποίησης) ως ένα από τα βασικότερα στάδια ελέγχου της καταλληλότητας μιας παρτίδας πριν την απελευθέρωσή της προς χρήση.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agol, Vadim I. (1997). Recombination and Other Genomic Rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology*, 8(2), 77-84. doi: <https://doi.org/10.1006/smv.1997.0112>

Agol, Vadim I. (2002). Picornavirus Genome: an Overview *Molecular Biology of Picornavirus*: American Society of Microbiology.

Ambros, V, & Baltimore, D. (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 255(14), 6739-6744.

Anwar, Azlinda, August, J. Thomas, & Too, Heng Phon. (2006). A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Analytical Biochemistry*, 352(1), 120-128. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.046>

Baggen, Jim, Thibaut, Hendrik Jan, Strating, Jeroen R. P. M., & van Kuppeveld, Frank J. M. (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 368-381. doi: 10.1038/s41579-018-0005-4

Baltimore, D., & Girard, M. (1966). An intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(2), 741-748. doi: 10.1073/pnas.56.2.741

Belnap, David M., McDermott, Brian M., Filman, David J., Cheng, Naiqian, Trus, Benes L., Zuccola, Harmon J., . . . Steven, Alasdair C. (2000). Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 73-78. doi: 10.1073/pnas.97.1.73

Bodian, D. (1955). Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science*, 122(3159), 105-108. doi: 10.1126/science.122.3159.105

Bodian, D., Morgan, I. M., & Howe, H. A. (1949). Differentiation of types of poliomyelitis viruses; the grouping of 14 strains into three basic immunological types. *Am J Hyg*, 49(2), 234-245.

Bolanaki, E., Kottaridi, C., Dedepsidis, E., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Pratti, A., . . . Markoulatos, P. (2008). Direct extraction and molecular characterization of enteroviruses genomes from human faecal samples. *Mol Cell Probes*, 22(3), 156-161. doi: 10.1016/j.mcp.2007.12.001

Bolanaki, E., Kottaridi, C., Markoulatos, P., Kyriakopoulou, Z., Margaritis, L., & Katsorchis, T. (2007). Partial 3D gene sequences of Coxsackie viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes*, 35(2), 129-140. doi: 10.1007/s11262-007-0083-2

Carter, J., & Saunders V. . (2013). Viorology: Principles and Applications (2nd ed.) *John Wiley & Sons Ltd*.

Casas, I., Powell, L., Klapper, P. E., & Cleator, G. M. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*, 53(1), 25-36. doi: 10.1016/0166-0934(94)00173-e

Casas, N., & Suñén, E. (2001). Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus* spp.) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol*, 90(1), 89-95. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01221.x

Caspar, D. L., & Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, 1-24. doi: 10.1101/sqb.1962.027.001.005

Cathcart, AL, Baggs, EL, & Semler, BL. (2014). Picornaviruses: Pathogenesis and Molecular Biology. . *In Reference Module in Biomedical Research*.

Cliver, D. O. (1997). Virus transmission via food. *World Health Stat Q*, 50(1-2), 90-101.

Combela, Nicolas, Holmblat, Barbara, Joffret, Marie-Line, Colbère-Garapin, Florence, & Delpeyroux, Francis. (2011). Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses*, 3(8), 1460-1484. doi: 10.3390/v3081460

Dalldorf, G., & Sickles, Grace M. (1948). An Unidentified, Filtrable Agent isolated from the Feces of Children with Paralysis (pp. 61-64): American Association for the Advancement of Science.

Daskou, M., Dimitriou, T. G., Alexopoulou, D. S., Tsakogiannis, D., Amoutzias, G. D., Mossialos, D., . . . Markoulatos, P. (2021). WarmStart colorimetric RT-LAMP for the rapid, sensitive and specific detection of Enteroviruses A-D targeting the 5'UTR region. *J Appl Microbiol*, 130(1), 292-301. doi: 10.1111/jam.14770

Daskou, M., Tsakogiannis, D., Alexopoulou, D. S., Dimitriou, T. G., Mossialos, D., Amoutzias, G. D., . . . Markoulatos, P. (2021). A colorimetric IsoPCR for the rapid and sensitive visual detection of high-risk HPV16 in clinical samples with hydroxynaphthol blue. *J Virol Methods*, 290, 114072. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114072

Daskou, M., Tsakogiannis, D., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., Mossialos, D., Kottaridi, C., . . . Markoulatos, P. (2019). WarmStart colorimetric LAMP for the specific and rapid detection of HPV16 and HPV18 DNA. *J Virol Methods*, 270, 87-94. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.023

Dedepsidis, E., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Kottaridi, C., Bolanaki, E., Levidiotou-Stefanou, S., . . . Markoulatos, P. (2007). Retrospective characterization of a vaccine-derived poliovirus type 1 isolate from sewage in Greece. *Appl Environ Microbiol*, 73(21), 6697-6704. doi: 10.1128/aem.00535-07

Dedepsidis, E., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., & Markoulatos, P. (2010). Correlation between recombination junctions and RNA secondary structure elements in poliovirus Sabin strains. *Virus Genes*, 41(2), 181-191. doi: 10.1007/s11262-010-0512-5

Dimitriou, T. G., Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., Ruether, I. G., Tsakogiannis, D., Fountoucidou, P., . . . Markoulatos, P. (2014). PCR assays for the identification of rare recombination types from VP1 to 3D genomic region of vaccine derived poliovirus strains. *Mol Cell Probes*, 28(4), 107-112. doi: 10.1016/j.mcp.2013.10.004

Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. *Annual Review of Microbiology*, 51(1), 151-178. doi: 10.1146/annurev.micro.51.1.151

Dotta, Francesco, & Sebastiani, Guido. (2014). Enteroviral Infections and Development of Type 1 Diabetes: <em>The Brothers Karamazov</em> Within the CVBs. *Diabetes*, 63(2), 384-386. doi: 10.2337/db13-1441

Duggal, Rohit, Cuconati, Andrea, Gromeier, Matthias, & Wimmer, Eckard. (1997). Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13786-13791. doi: 10.1073/pnas.94.25.13786

Echeverri, Angela C., & Dasgupta, Asim. (1995). Amino Terminal Regions of Poliovirus 2C Protein Mediate Membrane Binding. *Virology*, 208(2), 540-553. doi: https://doi.org/10.1006/viro.1995.1185

Egger, Denise, & Bienz, Kurt. (2002). Recombination of Poliovirus RNA Proceeds in Mixed Replication Complexes Originating from Distinct Replication Start Sites. *Journal of Virology*, 76(21), 10960-10971. doi: 10.1128/jvi.76.21.10960-10971.2002

Egger, Denise, Teterina, Natalya, Ehrenfeld, Ellie, & Bienz, Kurt. (2000). Formation of the Poliovirus Replication Complex Requires Coupled Viral Translation, Vesicle Production, and Viral RNA Synthesis. *Journal of Virology*, 74(14), 6570-6580. doi: 10.1128/jvi.74.14.6570-6580.2000

Ehrenfeld, Ellie, Domingo, Esteban, & Roos, Raymond P. (2010). *The Picornaviruses*: American Society of Microbiology.

Enders, J. F., Weller, T. H., & Robbins, F. C. (1949). Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. *Science*, 109(2822), 85-87. doi: 10.1126/science.109.2822.85

Fields, Bernard N., Knipe, David M., & Howley, Peter M. (2013). *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Figlerowicz, Magdalena, Alejska, Magdalena, Kurzyńska-Kokorniak, Anna, & Figlerowicz, Marek. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal research reviews*, 23(4), 488-518. doi: 10.1002/med.10045

Fikatas, A., Dimitriou, T. G., Kyriakopoulou, Z., Moschonas, G. D., Amoutzias, G. D., Mossialos, D., . . . Markoulatos, P. (2017). Detection of negative and positive RNA strand of poliovirus Sabin 1 and echovirus E19 by a stem-loop reverse transcription PCR. *Lett Appl Microbiol*, 65(3), 234-240. doi: 10.1111/lam.12766

Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M., & Glökler, J. F. (2015). Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*, 58(4), 189-194. doi: 10.2144/000114275

Flanegan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J., & Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(3), 961-965. doi: 10.1073/pnas.74.3.961

Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol*, 64(5), 1934-1945. doi: 10.1128/jvi.64.5.1934-1945.1990

Gamarnik, A. V., & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*, 12(15), 2293-2304. doi: 10.1101/gad.12.15.2293

Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., . . . Crainic, R. (2000). Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol*, 74(18), 8434-8443. doi: 10.1128/jvi.74.18.8434-8443.2000

Hierholzer, J. C., & Killington, R. A. (1996). Virus isolation and quantitation. *Virology Methods Manual*, 25-46. doi: 10.1016/B978-012465330-6/50003-8

Hogle, J. M., Chow, M., & Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229(4720), 1358-1365. doi: 10.1126/science.2994218

Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J., Yamamoto, S. P., . . . Noda, M. (2014). Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J Med Virol*, 86(12), 2019-2025. doi: 10.1002/jmv.23883

Jacobson, S. J., Konings, D. A., & Sarnow, P. (1993). Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol*, 67(6), 2961-2971. doi: 10.1128/jvi.67.6.2961-2971.1993

Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z., . . . Li, J. (2013). Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environ Sci Technol*, 47(9), 4590-4597. doi: 10.1021/es305282g

Jin, M., Zhao, Z. G., Wang, X. W., Shen, Z. Q., Xu, L., Yu, Y. M., . . . Li, J. W. (2012). The 40-80 nt region in the 5'-NCR of genome is a critical target for inactivating poliovirus by chlorine dioxide. *J Med Virol*, 84(3), 526-535. doi: 10.1002/jmv.23221

Johnson, R.T. (1998). *Viral Infections of the Nervous System*: Lippincott-Raven.

Jubb, George. (1915). A THIRD OUTBREAK OF EPIDEMIC POLIOMYELITIS AT WEST KIRBY. *The Lancet*, 185(4767), 67. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)63665-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)63665-1)

Karakasiliotis, I., Markoulatos, P., & Katsorchis, T. (2004). Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes*, 18(2), 103-109. doi: 10.1016/j.mcp.2003.09.009



Karakasiliotis, I., Paximadi, E., & Markoulatos, P. (2005). Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol*, 86(Pt 11), 3137-3142. doi: 10.1099/vir.0.80823-0

Kargar, Mohammad, Sadeghipour, Sara, & Nategh, Rakhshandeh. (2009). Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virology Journal*, 6(1), 149. doi: 10.1186/1743-422X-6-149

Kew, Olen M., Mulders, Mick N., Lipskaya, Galina Yu, da Silva, Edson E., & Patlansch, Mark A. (1995). Molecular epidemiology of polioviruses. *Seminars in Virology*, 6(6), 401-414. doi: [https://doi.org/10.1016/S1044-5773\(05\)80017-4](https://doi.org/10.1016/S1044-5773(05)80017-4)

Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., & Pallansch, M. A. (2006). Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ*, 55(8), 1-20.

Kirkegaard, K., & Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47(3), 433-443. doi: 10.1016/0092-8674(86)90600-8

Kitamura, Naomi, Semler, Bert L., Rothberg, Paul G., Larsen, Glenn R., Adler, Cheryl J., Dorner, Andrew J., . . . Wimmer, Eckard. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291(5816), 547-553. doi: 10.1038/291547a0

Koike, S., Taya, C., Kurata, T., Abe, S., Ise, I., Yonekawa, H., & Nomoto, A. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(3), 951-955. doi: 10.1073/pnas.88.3.951

Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J., & López-Pila, J. M. (1993). Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 59(4), 1213-1219. doi: 10.1128/aem.59.4.1213-1219.1993

Kottaridi, C., Bolanaki, E., Kyriakopoulou, Z., Dedepsidis, E., Pratti, A., & Markoulatos, P. (2007). Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(4), 407-412. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.007

Kottaridi, C., Bolanaki, E., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., & Markoulatos, P. (2006). Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch Virol*, 151(6), 1117-1132. doi: 10.1007/s00705-005-0697-4

Kottaridi, C., Bolanaki, E., & Markoulatos, P. (2004). Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study. *Mol Cell Probes*, 18(4), 263-269. doi: 10.1016/j.mcp.2004.02.003

Kurdtziel, A. S., Wilkinson, N., Langton, S., & Cook, N. (2001). Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables. *J Food Prot*, 64(5), 706-709. doi: 10.4315/0362-028x-64.5.706

Kyriakopoulou, Z., Amoutzias, G. D., Dimitriou, T. G., Tsakogiannis, D., Mossialos, D., & Markoulatos, P. (2018). Intra- and inter-serotypic recombinations in the 5' UTR-VP4 region of Echovirus 30 strains. *Arch Virol*, 163(2), 365-375. doi: 10.1007/s00705-017-3600-1

Kyriakopoulou, Z., Dedepsidis, E., Pliaka, V., Tsakogiannis, D., Pratti, A., Levidiotou-Stefanou, S., & Markoulatos, P. (2010). Full-genome sequence analysis of a multirecombinant echovirus 3 strain isolated from sewage in Greece. *J Clin Microbiol*, 48(5), 1513-1519. doi: 10.1128/jcm.00475-09

Kyriakopoulou, Z., Dedepsidis, E., Pliaka, V., Tsakogiannis, D., Ruether, I. G., Krikelis, A., & Markoulatos, P. (2011). Complete nucleotide sequence analysis of the VP1 genomic region of Echoviruses 6 isolated from sewage in Greece revealed 98% similarity with Echoviruses 6 that were characterized from an aseptic meningitis outbreak 1 year later. *Clin Microbiol Infect*, 17(8), 1170-1173. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03381.x

Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Amoutzias, G. D., & Markoulatos, P. (2015). Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus Genes*, 50(2), 177-188. doi: 10.1007/s11262-014-1152-y

Kyriakopoulou, Z., Tsolis, K., Pliaka, V., Tsakogiannis, D., Ruether, I. G., Gartzonika, C., . . . Markoulatos, P. (2013). Combined 5' UTR RFLP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses. *Arch Virol*, 158(1), 103-111. doi: 10.1007/s00705-012-1472-y

Kyriakopoulou, Zaharoula, Dedepsidis, Evaggelos, Pliaka, Vaia, Mastorakos, Panayotis, Stamati, Anastassia, Pratti, Anastassia, . . . Markoulatos, Panayotis. (2010). Molecular identification and full genome analysis of an echovirus 7 strain isolated from the environment in Greece. *Virus Genes*, 40(2), 183-192. doi: 10.1007/s11262-009-0446-y

Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M., & Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(1), 59-63. doi: 10.1073/pnas.74.1.59

Li, Y., Pan, Z., Ji, Y., Peng, T., Archard, L. C., & Zhang, H. (2002). Enterovirus replication in valvular tissue from patients with chronic rheumatic heart disease. *Eur Heart J*, 23(7), 567-573. doi: 10.1053/euhj.2001.2837

Lipskaya, GYu, Chervonskaya, E. A., Belova, G. I., Maslova, S. V., Kutateladze, T. N., Drozdov, S. G., . . . Agol, V. I. (1995). Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 7), 1687-1699. doi: 10.1099/0022-1317-76-7-1687

Lukashev, A. N., Lashkevich, V. A., Ivanova, O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E., & Ilonen, J. (2003). Recombination in circulating enteroviruses. *J Virol*, 77(19), 10423-10431. doi: 10.1128/jvi.77.19.10423-10431.2003

Lukashev, Alexander N., & Vakulenko, Yulia A. (2017). Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses. *Journal of General Virology*, 98(12), 2968-2981. doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000966>

Lukashev, Alexander N., Vakulenko, Yulia A., Turbabina, Natalia A., Deviatkin, Andrei A., & Drexler, Jan Felix. (2018). Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Reviews in Medical Virology*, 28(6), e2002. doi: 10.1002/rmv.2002

Mahmud, B., Horn, C. M., & Tapprich, W. E. (2019). Structure of the 5' Untranslated Region of Enteroviral Genomic RNA. *J Virol*, 93(23). doi: 10.1128/jvi.01288-19

Marjomäki, Varpu, Turkki, Paula, & Huttunen, Moona. (2015). Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. *Viruses*, 7(12), 6387-6399. doi: 10.3390/v7122945

Martínez-Salas, E. (2008). The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends Microbiol*, 16(5), 230-237. doi: 10.1016/j.tim.2008.01.013

Melnick, J. L. (1996). Enteroviruses : Polio-viruses, Coxsackie-viruses, Echo viruses, and Newer Enteroviruses. *Fields Virology*.

Melnick, Joseph L., Shaw, Ernest W., & Curnen, Edward C. (1949). A Virus Isolated from Patients Diagnosed as Non-Paralytic Poliomyelitis or Aseptic Meningitis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 71(3), 344-349. doi: 10.3181/00379727-71-17186

Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56(5), 855-865. doi: 10.1016/0092-8674(89)90690-9

Moscufo, N., Yafal, A. G., Rogove, A., Hogle, J., & Chow, M. (1993). A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *Journal of virology*, 67(8), 5075-5078. doi: 10.1128/JVI.67.8.5075-5078.1993

Mulders, M. N., Lipskaya, G. Y., van der Avoort, H. G., Koopmans, M. P., Kew, O. M., & van Loon, A. M. (1995). Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis*, 171(6), 1399-1405. doi: 10.1093/infdis/171.6.1399

Murray, Kenneth E., & Barton, David J. (2003). Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *Journal of virology*, 77(8), 4739-4750. doi: 10.1128/jvi.77.8.4739-4750.2003

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223-229. doi: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>

Nicholson, F., Meetoo, G., Aiyar, S., Banatvala, J. E., & Muir, P. (1994). Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *J Virol Methods*, 48(2-3), 155-166. doi: 10.1016/0166-0934(94)90115-5

Nikolaidis, M., Mimouli, K., Kyriakopoulou, Z., Tsimpidis, M., Tsakogiannis, D., Markoulatos, P., & Amoutzias, G. D. (2019). Large-scale genomic analysis reveals recurrent patterns of intertypic recombination in human enteroviruses. *Virology*, 526, 72-80. doi: 10.1016/j.virol.2018.10.006

Nomoto, Akio, Detjen, Barbara, Pozzatti, Rudy, & Wimmer, Eckard. (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268(5617), 208-213. doi: 10.1038/268208a0

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

Notomi, Tsugunori, Mori, Yasuyoshi, Tomita, Norihiro, & Kanda, Hidetoshi. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53(1), 1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9

Novak, J. E., & Kirkegaard, K. (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *Journal of virology*, 65(6), 3384-3387. doi: 10.1128/JVI.65.6.3384-3387.1991

Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A., & Pallansch, M. A. (1999). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1288-1293. doi: 10.1128/jcm.37.5.1288-1293.1999

Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., . . . Pallansch, M. A. (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*, 87(Pt 1), 119-128. doi: 10.1099/vir.0.81179-0

P. Vasickova, L. Dvorska, A. Lorencova, I. Pavlik. (2005). Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Veterinarni Medicina*(50), 89-104. doi: <https://doi.org/10.17221/5601-VETMED>

Palacios, G., & Oberste, M. S. (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of Neurovirology*, 11(5), 424-433. doi: 10.1080/13550280591002531

Pallansch, M. (2013). Enteroviruses : Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer enteroviruses. In D. M. K. P. M. Howley (Ed.), *Fields Virology 6ed* (pp. 490-530): Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business.

Paximadi, E., Karakasiliotis, I., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., Krikelis, V., & Markoulatos, P. (2006). Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes*, 32(2), 203-210. doi: 10.1007/s11262-005-6877-1

Pettersson, R F, Ambros, V, & Baltimore, D. (1978). Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *Journal of Virology*, 27(2), 357-365.

Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E. . (1999). Molecular Biology of poliovirus *Academic Press Encyclopedia of Virology 2e*.

Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., & Agol, V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic acids research*, 23(11), 1870-1875. doi: 10.1093/nar/23.11.1870

Pliaka, V., Achilleos, C., Kyriakopoulou, Z., Tsakogiannis, D., Ruether, I. G., Gartzonica, C., . . . Markoulatos, P. (2010). Determination of antigenic properties of vaccine derived poliovirus strains. *Vaccine*, 29(1), 26-33. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.10.028

Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., & Markoulatos, P. (2012). Risks associated with the use of live-attenuated vaccine poliovirus strains and the strategies for control and eradication of paralytic poliomyelitis. *Expert Rev Vaccines*, 11(5), 609-628. doi: 10.1586/erv.12.28

Racaniello, V. R. (2013). Picornaviridae: The viruses and their replication. In D. M. K. P. M. Howley (Ed.), *Fields virology 6th ed* (pp. 452-489): Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Racaniello, V. R., & Baltimore, D. (1981a). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214(4523), 916-919. doi: 10.1126/science.6272391

Racaniello, V. R., & Baltimore, D. (1981b). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8), 4887-4891. doi: 10.1073/pnas.78.8.4887

Rajtar, B., Majek, M., Polański, Ł, & Polz-Dacewicz, M. (2008). Enteroviruses in water environment--a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med*, 15(2), 199-203.

Ren, R. B., Costantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J., & Racaniello, V. R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*, 63(2), 353-362. doi: 10.1016/0092-8674(90)90168-e

Rieder, E., Paul, A. V., Kim, D. W., van Boom, J. H., & Wimmer, E. (2000). Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *Journal of virology*, 74(22), 10371-10380. doi: 10.1128/jvi.74.22.10371-10380.2000

Romanova, Lyudmila I., Blinov, Vladimir M., Tolskaya, Elena A., Viktorova, Ekaterina G., Kolesnikova, Marina S., Guseva, Elena A., & Agol, Vadim I. (1986). The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology*, 155(1), 202-213. doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90180-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90180-7)

Rossmann, M. G., He, Y., & Kuhn, R. J. (2002). Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*, 10(7), 324-331. doi: 10.1016/s0966-842x(02)02383-1

Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, 365-386. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365

Rueckert, R. R., Dunker, A. K., & Stoltzfus, C. M. (1969). The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 62(3), 912-919. doi: 10.1073/pnas.62.3.912

SA Sattar, JA Tetro. (2001).

*Foodborne Disease Handbook Second Edition, Revised and Expanded Volume 2: Viruses, Parasites, Pathogens, and HACCP Other Foodborne Viruses* (pp. 10).

Sauerbrei, A., & Wutzler, P. (2009). Testing thermal resistance of viruses. *Arch Virol*, 154(1), 115-119. doi: 10.1007/s00705-008-0264-x

Sean, P., & Semler, B. L. (2008). Coxsackievirus B RNA replication: lessons from poliovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 323, 89-121. doi: 10.1007/978-3-540-75546-3\_5

Shiomi, H., Urasawa, T., Urasawa, S., Kobayashi, N., Abe, S., & Taniguchi, K. (2004). Isolation and characterisation of poliovirus mutants resistant to heating at 50 degrees Celsius for 30 min. *J Med Virol*, 74(3), 484-491. doi: 10.1002/jmv.20202

Shirato, Kazuya, Semba, Shohei, El-Kafrawy, Sherif A., Hassan, Ahmed M., Tolah, Ahmed M., Takayama, Ikuyo, . . . Azhar, Esam Ibraheem. (2018). Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 258, 41-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.05.006>

Siafakas, N., Markoulatos, P., & Levidiotou-Stefanou, S. (2004). Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Mol Cell Probes*, 18(6), 389-398. doi: 10.1016/j.mcp.2004.06.005

Siafakas, N., Markoulatos, P., & Stanway, G. (2002). Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects. *J Mol Evol*, 55(6), 638-652. doi: 10.1007/s00239-002-2359-4

Siafakas, N., Markoulatos, P., Stanway, G., Tzanakaki, G., & Kourea-Kremastinou, J. (2002). A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Mol Cell Probes*, 16(3), 209-216. doi: 10.1006/mcpr.2002.0414

Siafakas, N., Papaventsis, D., Levidiotou-Stefanou, S., Vamvakopoulos, N. C., & Markoulatos, P. (2005). Classification and structure of echovirus 5'-UTR sequences. *Virus Genes*, 31(3), 293-306. doi: 10.1007/s11262-005-3244-1

Simonet, J., & Gantzer, C. (2006). Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *J Appl Microbiol*, 100(4), 862-870. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02850.x

Stanway, G. (1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol*, 71 ( Pt 11), 2483-2501. doi: 10.1099/0022-1317-71-11-2483

Summers, D. F., & Maizel, J. V., Jr. (1968). Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(3), 966-971. doi: 10.1073/pnas.59.3.966

Svitkin, Yuri V., Costa-Mattioli, Mauro, Herdy, Barbara, Perreault, Sandra, & Sonenberg, Nahum. (2007). Stimulation of picornavirus replication by the poly(A) tail in a cell-free extract is largely independent of the poly(A) binding protein (PABP). *RNA (New York, N.Y.)*, 13(12), 2330-2340. doi: 10.1261/rna.606407

Trask, J.D, Vignec, A. J., & Paul, J. R. (1938). Poliomyelitis virus in human stools. *Journal of the American Medical Association*, 111(1), 6-11. doi: 10.1001/jama.1938.02790270008002

Tucker, S. P., Thornton, C. L., Wimmer, E., & Compans, R. W. (1993). Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *Journal of virology*, 67(7), 4274-4282. doi: 10.1128/JVI.67.7.4274-4282.1993

van der Linden, L., Wolthers, K. C., & van Kuppeveld, F. J. (2015). Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*, 7(8), 4529-4562. doi: 10.3390/v7082832

Verheyden, B., Lauwers, S., & Rombaut, B. (2003). Quantitative RT-PCR ELISA to determine the amount and ratio of positive- and negative strand viral RNA synthesis and the effect of guanidine in poliovirus infected cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(2), 303-308. doi: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00286-3)

Ward, Bryan K., & Irving, Louise G. (1987). Virus survival on vegetables spray-irrigated with wastewater. *Water Research*, 21(1), 57-63. doi: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90099-6)

Whitton, J. L., Cornell, C. T., & Feuer, R. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol*, 3(10), 765-776. doi: 10.1038/nrmicro1284

Wimmer, Eckard, Hellen, Christopher U. T., & Cao, Xuemei. (1993). GENETICS OF POLIOVIRUS. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 353-436. doi: 10.1146/annurev.ge.27.120193.002033



Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol*, 124(3), 626-643. doi: 10.1111/jam.13647

Yi, Eun-Je, Shin, Yun-Ju, Kim, Jeong-Hwan, Kim, Tae-Gyun, & Chang, Sun-Young. (2017). Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clinical and experimental vaccine research*, 6(1), 4-14. doi: 10.7774/cevr.2017.6.1.4

Yin, Jiang, Paul, Aniko V., Wimmer, Eckard, & Rieder, Elizabeth. (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *Journal of virology*, 77(9), 5152-5166. doi: 10.1128/jvi.77.9.5152-5166.2003

Yogo, Y., & Wimmer, E. (1972). Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(7), 1877-1882. doi: 10.1073/pnas.69.7.1877

Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., . . . Ictv Report, Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol*, 98(10), 2421-2422. doi: 10.1099/jgv.0.000911

## 7. **ABSTRACT**

Enteroviruses are members of *Picornaviridae* family, *Enterovirus* genus and are classified into class IV according to Baltimore classification system, since their genome consists of a positive sense single stranded RNA molecule. Enteroviruses are small, non-enveloped viruses, with an icosahedral protein capsid protecting their genetic material. Human Enteroviruses are classified into four groups: EV-A, EV-B, EV-C and EV-D and transmitted via fecal-oral route. They have been detected in clinical samples, so as well as in food and in the environment.

The aim of the present PhD thesis was the molecular monitoring of thermal inactivation efficiency of Enteroviruses strains Sabin 1 and Echo 12, which belong to EV-C and EV-B respectively, and reveal the impact of thermal inactivation on the integrity of viral genome and the subsequent aptitude of Sabin 1 and Echo 12 to infect their hosts and complete successfully their replication cycle. The selection of two viral strains that belong to different groups of the same genus was intended in order to identify similarities and differences in their thermal inactivation process.

At the initial part of the present study, we developed kinetics for each strain targeting firstly the positive strand in order to detect the Enterovirus genome and secondly the negative strand to detect their replicating activity and thus their capacity to successfully infect cell lines. For the detection of the negative strand, we designed a Stem-Loop Reverse Transcription Real-Time PCR assay that shows high sensitivity and specificity due to the thermodynamically stable form of the RT primer. Furthermore, the specific stem-loop primer used in Reverse Transcription assay was designed to target the 5'UTR of Enteroviruses which is a conserved region among *Enterovirus* genus. As a result, this molecular assay can be used to detect the negative strand in most Enterovirus strains. This assay allowed the detection of the negative strand (replicative strand) of Sabin 1 and Echo 12. Thus, we created one kinetic for replication activity of each strain in two virus concentrations, a high  $10^6$  CCID<sub>50</sub> and a lower concentration 10 CCID<sub>50</sub> in certain hours after the infection of a cell culture. Simultaneously, we created kinetics for the detection of the positive strand in certain hours after the infection of a cell culture. For the detection of the positive strand, we performed a conventional Real Time PCR assay by using the universal primer set ENV2/ENV1 which targets the 5'UTR of the positive strand of Enteroviruses. The results proved that both

strains showed a similar pattern for the detection of their negative strand for both concentrations. For the  $10^6$  CCID<sub>50</sub> concentration the negative strand was detected 4 hours post infection of the cell culture for both strains, while for the lower concentration the negative strand was detected 24 hours post infection of the cell culture. This practically means that an actively replicating Sabin 1 or Echo 12 strain concerning the  $10^6$  CCID<sub>50</sub> concentration can be detected 4 hours post infection of the cell culture and 24 hours post infection of the cell culture concerning the 10 CCID<sub>50</sub> concentration. These results compared with those which occurred from the CPE monitoring in a cell culture inoculation reveal that the Stem-Loop Reverse Transcription Real-Time PCR assay can detect the replicating activity of Enteroviruses faster than the cell culture. As for the positive strand, it was detected 2 hours post infection of the cell culture in the higher concentration, while for the lower concentration of Sabin 1 and Echo 12 strains it was detected 2 and 4 hours post infection respectively. The difference between the two strands is due to the fact that the positive strand exists in higher concentration levels (30-50 times) into the cells than the negative strand.

Moreover, the kinetics that were developed concerning the lower concentration (10 CCID<sub>50</sub>) were implemented in 15 cerebrospinal fluid clinical samples (CSF), that were previously characterized as positive for Enteroviruses. In CSF, Enteroviruses exist in very low concentrations explaining why we decided to use the kinetics that were developed for the concentration of 10 CCID<sub>50</sub>. It revealed that actively replicating Enteroviruses were detected only in 5 out of 15 CSF samples, while in all samples their positive RNA genome was detected. The strains that were positively identified for both strands were subjected to molecular cloning and sequencing. The results showed that 3/5 were identified as Echovirus 30, 1/5 was identified as Coxsackievirus B3 and 1/5 as Coxsackievirus B5, proving that through the present molecular assay we can detect the negative RNA strand in the most strains of *Enterovirus* genus, as the stem loop RT primer was designed to target the 5'UTR of Enteroviruses.

These kinetics can be used as a confirmatory method in order to test the effectiveness of inactivation of Enteroviruses in shorter time compared to cell cultures. In addition, they can be used in Enterovirus strains that cannot induce cytopathic effect in existing cell lines, such as some Coxsackievirus A strains.

Subsequently, to the next part of the present study we identified the appropriate inactivation temperatures for the strains S1 and E12 that were used in two different

concentrations, a high ( $10^6$ CCID<sub>50</sub>) and a low (10 CCID<sub>50</sub>) by using an integrated system including cell culture and molecular assays. Moreover, we tested the impact of inactivation on viral genome targeting the most sensitive regions of viral genome (5'UTR, 3C, 3D and 3'UTR) for strand breaks. We determined that the most susceptible region to thermal inactivation is the 3'UTR, whereas the 5'UTR was determined as the most resistant. These results were also confirmed by calculating the GC content for both 5'UTR and 3'UTR regions. Furthermore, due to the importance of 5'UTR for Enterovirus detection, we decided to study this region more extensively in order to determine precisely the point of strand break after thermal processing at 82°C, which was identified as the appropriate inactivation temperature for both strains that were used. By this way, the break in this region was determined to be located near to the annealing site of the universal UC53 primer (position 588-606nt).

The last goal of the present study was the development of an isothermal molecular assay (Real Time RT-LAMP) with high specificity and sensitivity for the detection of Enteroviruses, as an alternative approach in order to test the effectiveness of thermal inactivation of Enteroviruses targeting their 5'UTR region. Thus, we developed a Real Time RT-LAMP assay that can provide in one step (Reverse Transcription and amplification) the amplification of an RNA template under isothermal conditions in 60min. In this method 6 primers targeting the 5'UTR of Enteroviruses were designed and used. In the reaction mixture a specific Bst2.0 DNA polymerase with strand displacement activity and the WarmStartRTx Reverse Transcriptase were included. In the reaction mixture a fluorescent dye was included as well in order to provide results in real time during the reaction by measuring the fluorescence emission. The results validated that the present Real Time RT-LAMP assay can be used successfully in order to test the effectiveness of thermal inactivation of the strain Sabin 1 concerning the higher ( $10^6$ CCID<sub>50</sub>) concentration, as they were in agreement with the results from the conventional Real Time PCR. Instead, for the Sabin 1 10 CCID<sub>50</sub> it was proved that this method is inappropriate to test the effectiveness of thermal inactivation due to its sensitivity limit. During thermal processing the viral titer is reduced significantly and as a result it cannot be detected. In conclusion, for concentrations below 10 CCID<sub>50</sub> the conventional Real Time PCR is the appropriate method in order to test the effectiveness of thermal inactivation. Same results occurred for the strain Echo 12 as well.

Summarizing, we proved that thermal inactivation affects the integrity of Enterovirus genome as it causes breaks in many regions, with the 3'UTR identified to be the

most sensitive region, whereas the 5'UTR determined as the most resistant in thermal inactivation. It was also revealed that there is a correlation between the integrity of viral genome and viral infectivity. So, in order to test the effectiveness of thermal inactivation it is essential to use an integrated system including cell culture for 2 or 3 passages combined with molecular assays testing for breaks on 3'UTR and 5'UTR and detecting the positive but mainly the negative strand of Enteroviruses, while the detection of their positive RNA does not reflect their ability to replicate and infect their hosts.

## 8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **M.Daskou**, T.G. Dimitriou, D.S Alexopoulou, D.Tsakogiannis, G.D Amoutzias, D.Mossialos, Z.Kyriakopoulou, P. Markoulatos

WarmStart colorimetric RT-LAMP for the rapid, sensitive and specific detection of Enteroviruses A-D targeting the 5' UTR region.

Journal of Applied Microbiology, January 2021, <https://doi.org/10.1111/jam.14770>

2. **M.Daskou**, T.G. Dimitriou, G. Kouklamani Giannouli, M. Nikolaidis, D.Mossialos, G.D Amoutzias, P. Markoulatos

Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) that detects enteroviruses by targeting the highly conserved 5'UTR region.

Virus Genes, January 2020, doi: 10.1007/s11262-020-01732-w